

Tartu Ülikool  
Loodus- ja täppisteaduste valdkond  
Ökoloogia ja maateaduste instituut  
Geograafia osakond

Bakalaureusetöö geograafias (12 EAP)

**Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioloogilisele lämmastikuringele  
kaldaäärses lepikus**

**Kristel Reiss**

Juhendajad: PhD Mikk Espenberg

PhD Ülo Mander

Tartu 2021

## **Annotatsioon**

### **Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioloogilisele lämmastikuringele kaldaäärsetes lepinkudes**

Lühiajaliste üleujutuste mõju erinevatele ökosüsteemidele pakub aina enam huvi kliimamuutuste ja ekstreemsete sademete sagenemise perspektiivis. Uurimistöö eesmärgiks oli hinnata lühiajalise üleujutuse mõju lämmastikuringe protsesside potentsiaalile ja neist tulenevatele dilämmastikoksiidi (N<sub>2</sub>O) emissioonidele mullast ja puutüvedest ning hinnata nende seoseid füüsilis-keemiliste parameetritega kaldaäärsetes lepinkudes. Lühiajaline üleujutus mõjutas oluliselt bakterite, arhede *amoA*, n-damo spetsiifilise 16S rRNA ning *nosZII* geene omavate mikroorganismide arvukust. Olulist eksperimentaalset üleujutuse mõju mulla N<sub>2</sub>O emissioonidele ei leitud. Tulemustest saab järeldada, et lämmastikuringe markergeenide arvukust ja protsesse mõjutasid enamasti järsud mullaniiskuse muutused.

Märksõnad: muld, N<sub>2</sub>O, lämmastikuringe, markergeenid, üleujutus

CERCS kood: P510 – Füüsiline geograafia, geomorfoloogia, mullateadus, kartograafia, klimatoloogia

## **Abstract**

### **Microbial nitrogen cycle response to short-term flooding in a riparian forest soil**

The impact of short-term floods on different ecosystems is of increasing interest in the context of climate change and the increase in extreme rainfall. The aim of the study was to assess how short-term flooding impacted nitrogen cycle processes and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from soil and tree stems while also considering the correlation with physicochemical parameters in riparian alder forests. The short-term flooding significantly affected the abundance of bacteria and microorganisms with archaeal *amoA*, n-damo-specific 16S rRNA and *nosZII* genes. No significant impact of flooding on soil N<sub>2</sub>O emissions was identified. It can be concluded that marker genes and nitrogen cycle processes were influenced, above all, by sudden changes in soil moisture.

Keywords: soil, N<sub>2</sub>O, nitrogen cycle, marker genes, flooding

CERCS code: P510 – Physical geography, geomorphology, pedology, cartography, climatology

# Sisukord

<b>Kasutatud lühendid .....</b>	<b>5</b>
<b>Sissejuhatus.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Kirjanduse ülevaade.....</b>	<b>8</b>
1.1 Kaldaäärsete metsade ökosüsteemid .....	8
1.2 Kliimamuutused ja üleujutuste mõju .....	9
1.3 Lämmastikuringe .....	10
1.3.1 Lämmastikuringe metsamuldades .....	11
1.3.2 Lämmastikuringe protsessid ja markergeenid.....	12
1.4 Kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon .....	14
<b>2. Metoodika .....</b>	<b>16</b>
2.1 Prooviala kirjeldus .....	16
2.2 Üleujutuskatse ja mullaproovide kogumine .....	17
2.3 DNA eraldamine .....	17
2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil.....	17
2.5 Andmeanalüüs ja autori osalus .....	20
<b>3. Tulemused.....</b>	<b>21</b>
3.1 Prooviala füüsikalise-keemilised parameetrid.....	21
3.2 Bakterite ja arhede markergeenid .....	22
3.3 Lämmastikuringe markergeenid .....	23
3.4 Lämmastikoksiidi emissioonid mullast ja puutüvedest .....	27
3.5 Markergeenide ja keskkonnaparameetrite vahelised seosed .....	29
<b>4. Arutelu.....</b>	<b>32</b>
<b>Kokkuvõte.....</b>	<b>36</b>
<b>Summary.....</b>	<b>38</b>
<b>Tänuavaldused.....</b>	<b>40</b>
<b>Kasutatud kirjandus.....</b>	<b>41</b>

<b>Lisad 1-5.....</b>	<b>49</b>
Lisa 1 .....	49
Lisa 2.....	50
Lisa 3 .....	51
Lisa 4.....	52
Lisa 5.....	53

## Kasutatud lühendid

*amoA* – nitrifikatsiooni ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ) märklaudgeen

AOA – ammoniaaki oksüdeerivad arhed

AOB – ammoniaaki oksüdeerivad bakterid

$\text{CH}_4$  – metüülhüdriid ehk metaan

COMAMMOX – täielik ammooniumi oksüdeerimine

DNRA – dissimilatoorne nitraadi redutseerimine ammooniumiks

$\text{N}_2$  – diämmastik ehk molekulaarne lämmastik

$\text{N}_2\text{O}$  – diämmastikoksiid ehk naerugaas

n-damo – nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine

$\text{NH}_4^+$  – ammoonium

*nifH* – õhulämmastiku fikseerimise ( $\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_4^+$ ) märklaudgeen

*nirK* – denitrifikatsiooni (etapp  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) märklaudgeen

*nirS* – denitrifikatsiooni (etapp  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ) märklaudgeen

$\text{NO}_2^-$  – nitritioon

$\text{NO}_3^-$  – nitraatioon

*nosZI* – denitrifikatsiooni (etapp  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) märklaudgeen

*nosZII* – denitrifikatsiooni (etapp  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ ) märklaudgeen

*nrfA* – DNRA ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$ ) märklaudgeen

qPCR – kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon

## Sissejuhatus

Kliimat mõjutavad mitmed globaalsed ning piirkondlikud tegurid, ent suur mõju on ka inimtegevusel. Rahvaarvu suurenemine, fossiilkütuste põletamine, põllumajanduse ja loomakasvatuse viljelemine on mõned otsesed või kaudsed põhjused, miks atmosfääri emiteerub järjest rohkem ohtlikke kasvuhoonegaase, mis omakorda mõjutavad Maa soojusbilanssi. Rahvusvaheline kliimamuutuste paneel (IPCC) on näidanud temperatuuri tõusu ühe kraadi võrra alates tööstusrevolutsioonist ja soojenemine on jätkutrendis (Shukla *et al.*, 2019). Kiireid muutusi maismaa- ja ookeanide ökosüsteemides, nt mulla degradatsiooni (Shukla *et al.*, 2019) ja ookeanivee hapestumist (Allen *et al.*, 2019), on seostatud ekstreemsete kliimasündmuste sagenemisega. Parasvöötmepiirkondades on globaalsed kliimamuutused toonud kaasa sagedama ja intensiivsema sademete koguse, mille tagajärjel on üleujutuste oht kasvanud (Guilyardi *et al.*, 2018). Üleujutused mõjutavad mulla hüdroloogilist režiimi (Mander *et al.*, 2008) ja mikroorganismide arvukust (Hutchins *et al.*, 2019). Need muutused mõjutavad mullas toimuvaid biogeokeemilisi protsesse, mis reguleerivad aineringeid ja kasvuhoonegaaside vooge (Schindler *et al.*, 2020).

Inimene on märkimisväärselt sekkunud lämmastikuringe toimimisse (Galloway *et al.*, 2008). Lämmastik on paljudes ökosüsteemides piiratud kättesaadavusega element, millel on suur mõju taimede kasvule. Lämmastiku lisamine soodustab taimekasvu (LeBauer & Treseder, 2008), mille tõttu toodetakse ja kasutatakse lämmastikväetisi rohkelt põllumajanduses. Inimtegevuse tagajärjel rohkema lämmastiku jõudmine ringlusesse mõjutab atmosfääris olevate lämmastikühendite kontsentratsiooni, veekogude eutrofeerumist ja nitraadi leostumist põhjavette (Cameron *et al.*, 2013).

Lämmastikku esineb nii atmosfääris, biosfääris, pedosfääris, hüdrofääris ja setetes. Lämmastiku muundumisprotsesse viivad läbi mikroorganismid. Mikrobioloogilise lämmastikuringe olulisemateks protsessideks maismaaökosüsteemides on molekulaarse lämmastiku ( $N_2$ ) fikseerimine, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon, dissimilatoorne nitraadi ( $NO_3^-$ ) redutseerimine ammooniumiks ( $NH_4^+$ ) (DNRA), ammooniumi täielik oksüdeerimine (COMAMMOX) ja nitritist ( $NO_2^-$ ) sõltuv anaeroobne metaani ( $CH_4$ ) oksüdeerimine (n-damo) (Kuypers *et al.*, 2018).

Mitmed uuringud on näidanud gaasivoogude mõõtmistega mullast, et lämmastikuringe protsesse mõjutavad keskkonnamuutused (Mander *et al.*, 2008; Soosaar *et al.*, 2011). Molekulaarsel tasandil metsamuldade uurimine võimaldab mõista konkreetsete

aineringeprotsesside panuseid ning vastureaktsioone muutustele (Smith & Osborn, 2009). Arusaamine metsade lämmastikuringe toimimisest (Truu *et al.*, 2020) või kliimamuutustega kohanemisest aitab prognoosida võimalikke muutusi metsade ökosüsteemides (Mander *et al.*, 2008). Lämmastikuringe protsesse keskkonnas on võimalik hinnata markergeenidega ja nende arvukuse määramiseks saab kasutada kvantitatiivset polümeraasahelreaktsiooni (qPCR) (Espenberg *et al.*, 2018).

Bakalaureusetöö eesmärk on uurida lühiajalise üleujutuse mõju lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsesside potentsiaalile ja nende seostele füüsikalise-keemiliste parameetritega ning diämmastikoksiidi (N<sub>2</sub>O) emissioonile kaldaäärses lepikus.

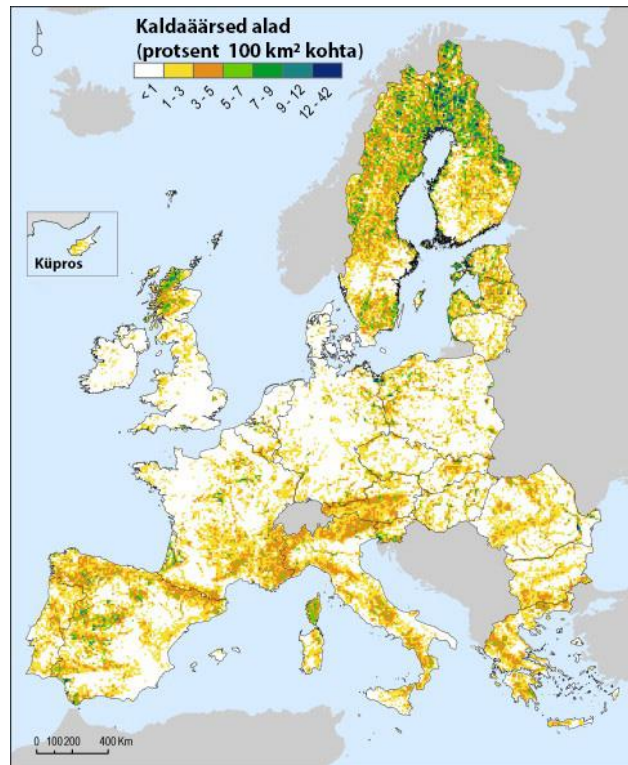
# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Kaldaäärsete metsade ökosüsteemid

Ökosüsteemi moodustavad biootilised ja abiootilised tegurid, kus kõik komponendid on omavahel vastastikku seotud. Ökosüsteeme iseloomustavad toitainete, energia, materjalide ja informatsiooni vood, mis seovad erinevate liikide eraldiseisvad kooslused üheks terviklikuks süsteemiks (Levin, 1998). Ühtse funktsionaalse süsteemi moodustavad omavahel ka metsad. Metsade ökosüsteemide funktsionaalsusel on samuti otsene mõju inimestele. Metsad pakuvad inimestele eluks vajalikke majanduslikke, sotsiaalseid ja esteetilisi teenuseid, nt olles puidu-, energia- ja toiduallikaks (Bonan, 2008). Metsa ökosüsteem ulatub risosfäärist (juurtest mõjutatud mullakihist) puude latvadeni atmosfääris (Waring & Schlesinger, 1985). Ühtse süsteemi moodustavad seal elavad elusorganismid (Waring & Schlesinger, 1985). Metsaökosüsteemides toimuvad füüsilised, keemilised ja bioloogilised protsessid mõjutavad globaalset kliimat (Bonan, 2008). Metsad reguleerivad nt aineringeid süsiniku sidumisega, mis leevendab ka globaalset soojenemist (Prävalie, 2018). Süsiniku sidumisega eemaldatakse atmosfäärist süsinikdioksiid ( $\text{CO}_2$ ), mis neelab pikalainelist soojuskiirgust. Globaalset soojenemist leevendab ka evapotranspiratsioon, millel on kliimat jahutav toime, moodustades pilvi ja sademeid (Prävalie, 2018). Metsad aitavad säilitada ka globaalset mitmekesisust (Levin, 1998). Metsad katavad ligikaudu 30% maismaast Maal (ca 42 miljonit  $\text{km}^2$ ) (Bonan, 2008) ja Eesti pindalast 51,4% (Keskkonnaministeeriumi..., 2020).

Kaldaäärseid ja üleujutuse all olevaid alasid on Euroopas pindalalt kokku 91 144  $\text{km}^2$  (joonis 1) (Clerici *et al.*, 2013). Umbes 54% neist aladest on kaetud metsaga. Eestis moodustavad kaldaäärsed ja üleujutuse all olevad alad 4% riigi pindalast (Clerici *et al.*, 2013). Euroopa kaldaäärsetes ökosüsteemides on levinud hall lepp (Lõhmus *et al.*, 1996). See on vähenõudlik puuliik, mis on kohanenud kasvama niisketes tingimustes (Johansson, 1999). Hall lepp katab Eestist 2,1  $\text{km}^2$  suuruse ala (Keskkonnaministeeriumi..., 2020) ja Euroopast 15 000  $\text{km}^2$  suuruse maaala (Caudullo *et al.*, 2017). Halli leppa iseloomustab kiire kasv ning tema eluiga on tavaliselt 50–70 aastat (Maamets, 2004). Halli lepa metsades tekkiv kõdu aitab parandada mulla omadusi ning puud võivad toimida tõhusate puhvritena kaldaäärsetes piirkondades (Lõhmus *et al.*, 1996).





Joonis 1. Kaldaäärsete alade levik Euroopas, mis on liigvee poolt mõjutatud (Clerici *et al.*, 2013)

Kaldaäärseid metsi iseloomustab perioodiline üleujutus ning nad on olulised oma kõrge biomassi tootlikkuse ja suure liigirikkuse tõttu (Naiman & Decamps, 1997). Lisaks pakuvad nad ökoloogilisi teenuseid, mille hulka kuuluvad üleujutuste ja erosiooni ulatuste pärssimine ning põllumajandusmaadelt pärinevate üleliigsete toitainete eemaldamine keskkonnast ja reostuse mõju leevendamine (Mander *et al.*, 1995; Correll, 1996; Lõhmus *et al.*, 1996; Kozłowski, 2002). Kaldaäärsete piirkondade toitainete eemaldamise efektiivsust mõjutab sealne taimkate (Petersen *et al.*, 2020) ja mulla lõimis (Pinay *et al.*, 1995). Pinay ja teised (1995) leidsid, et savise lõimisega kaldaäärsed mullad hoiavad hõljuvaid osakesi üleujutuse ajal paremini kinni kui liivase lõimisega mullad. Kaldaäärsete metsade ökosüsteemid on keerukad, ent neil on oluline bioloogiline väärtus (Naiman *et al.*, 2002), mille tõttu on tähtis uurida nende reaktsiooni kliimamuutustele.

## 1.2 Kliimamuutused ja üleujutuste mõju

Kliimamuutustel on otsene ja kaudne mõju inimestele ja looduses toimuvatele protsessidele. Kasvuhoonegaaside kontsentratsioonide atmosfääris suurenemisega suureneb ka kasvuhooneefekt, mille üheks tagajärjeks on globaalse keskmise temperatuuri tõus. Temperatuurimuutused on kaasa toonud ekstreemsete ilmastikusündmuste sagenemise ja

intensiivistumise, kõrbestumise ja mulla degradeerumise (Shukla et al., 2019). Näiteks on parasvöötmes saagenud sajuühtlused ja suurenenud üleujutuste oht (Guilyardi *et al.*, 2018). Arvatakse, et üleujutuste sagedus võib Euroopas järgmise saja aasta jooksul isegi kahekordistuda (Alfieri *et al.*, 2015).

Üleujutused võivad põhjustada elupaikade ajutist või püsivat kadu ja suurendada kokkupuudet toksiliste ühenditega (Kozłowski, 2002). Samuti muudavad üleujutused ökosüsteemide ainevahetust, hingamist ja fotosünteesi (Kozłowski, 2002). Üleujutuste käigus väheneb hapniku kättesaadavus ning seeläbi võib väheneda fotosünteesimine (Ewing, 1996), mis omakorda aeglustab taimede kasvu ja biomassi akumulierimist (Mommer & Visser, 2005). Hapniku halval kättesaadavusel, toksiliste ühendite kogunemisel ja CO<sub>2</sub> akumulierumisel mulda võivad üleujutused mõjutada ka taimejuurte kasvu ning põhjustada nende kõdunemist (Kozłowski, 1997). Samas on üleujutuste taluvus taimeliikidel erinev ning mitmed liigid on anatoomiliselt, morfoloogiliselt ja füsioloogiliselt kohenenud liigveedega (Kozłowski, 1997). Peamiselt mõjutab taime liigvee taluvust selle vanus ja üleujutuse kestus, ala ja vee karakteristikud (Kozłowski, 1997).

Üleujutused mõjutavad mullas toimuvaid protsesse ja kasvuhoonegaaside emissioone. Üleujutustest tulenev anaeroobsus suurendab CH<sub>4</sub> emissiooni mullast (Mander *et al.*, 2015) ja puutüvedest (Schindler *et al.*, 2020). Lisaks on leitud, et lühiajaliste üleujutustega suurenevad N<sub>2</sub>O emissioonid mullast (Mander *et al.*, 2011). Teisalt on leitud, et lühiajalised üleujutused ei mõjuta oluliselt N<sub>2</sub>O vooge maapinnast ning emissioon suureneb pärast mullaniiskuse vähenemist (Hernandez & Mitsch, 2006).

Lühiajalistel üleujutustel võib olla ka positiivne efekt, sest üleujutustega suureneb ressursside, nt vee ja mineraalainete kättesaadavus (Wright *et al.*, 2015). Lisaks võivad üleujutused luua uusi elupaiku (Poff, 2002) ning poolkõrbelistes ja kõrbelistes piirkondades suurendada piirkonna liigirikkust (Garssen *et al.*, 2015). Wright ja teised (2015) leidsid, et lühiajaline madala intensiivsusega üleujutus tõstab taimekoosluste tootlikkust, kui nad kasvavad bioloogiliselt mitmekesisel alal. Lisaks on lühiajaliste üleujutuste mõju üldiselt väiksem bioloogiliselt mitmekesisematel aladel (Wright *et al.*, 2017).

### **1.3 Lämmastikuringe**

Lämmastik on vees hästi lahustuv element, mis on vajalik kõikidele elusorganismidele valkude ja nukleiinhapete sünteesiks (Kuypers *et al.*, 2018). Kõige rohkem esineb vaba lämmastikku atmosfääris N<sub>2</sub> (Kuypers *et al.*, 2018) ja bioloogiliselt seotakse N<sub>2</sub> peamiselt

lämmastikku fikseerivate organismide abil, kes muundavad  $N_2$  kättesaadavaks paljudele teistele elusorganismidele (Vitousek *et al.*, 1997). Maismaaökosüsteemides on lämmastik üsna piiratud kättesaadavusega. Olenevalt mullatüübist on mulla ülemises 15 cm paksuses kihis tavaliselt 2000 kuni 12 000 kg N ha<sup>-1</sup> (Cameron *et al.*, 2013). Lämmastik on mullas tavaliselt kas orgaanilise ainenä, mullas seotuna elavatesse organismidesse ja mikroorganismidesse, mullalahuses mineraalse lämmastikuna ( $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$  ja  $NO_2^-$ ) või ammoniumioonidena, mida hoiavad kinni savimineraalid ja orgaaniline materjal (Cameron *et al.*, 2013).

### 1.3.1 Lämmastikuringe metsamuldades

Kaldaäärseid ökosüsteemid on lämmastikuringes olulise tähtsusega (Moon *et al.*, 2020). Kaldaäärseid piirkondi vaadeldakse tihti kui puhveralasid, mis aitavad leevendada põllumajanduse negatiivset mõju keskkonnale (Moon *et al.*, 2020). Näiteks parandavad kaldaäärseid ökosüsteemid pinna- ja põhjavee kvaliteeti omastades veest üleliigset lämmastikku (Correll, 1996; Petersen *et al.*, 2020). Üleliigse lämmastiku omastamise efektiivsust mõjutab kaldaäärsete puhveralade suurus ja taimkate (Petersen *et al.*, 2020). Petersen ja teised (2020) näitasid, et kohaliku taimekooslusega väiksemad puhveralad on efektiivsemad üleliigse lämmastiku sidujad kui invasiivsete liikidega laiemad kaldaäärseid piirkonnad. Lisaks on kaldaäärsetes metsas domineerivatel puuliikidel oluline mõju mulla keemilistele omadustele, mis omakorda mõjutab lämmastikuringe protsesse (Truu *et al.*, 2020), nt põhjustavad lepa juured muutusi mikroorganismide arvukuses risosfääris (Gonzalez *et al.*, 1995). Lepa juured soodustavad ammonifitseerivate mikroorganismide tegevust ja inhibeerivad nitrifitseerivaid mikroorganisme (Gonzalez *et al.*, 1995). Sellest saab järeldada, et muutused kaldaäärsetes ökosüsteemides võivad mõjutada selle efektiivsust ja vähendada toitainete omastamist, mille tõttu suureneb üleliigse lämmastiku ärakanne ümbritsevasse looduskeskkonda (Petersen *et al.*, 2020).

Paljud bioloogilist lämmastikku fikseerivad mikroorganismid on sümbioosis endast kõrgemate taimeliikidega (Vitousek *et al.*, 1997). Halli lepa juurestikus elavad sümbioosis *Frankia* perekonda kuuluvad bakterid, kes on võimelised atmosfäärist  $N_2$  siduma. Sümbioosi tõttu on taimed võimelised kasvama ka ebasoodsamates tingimustes (Karthikeyan *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2007).

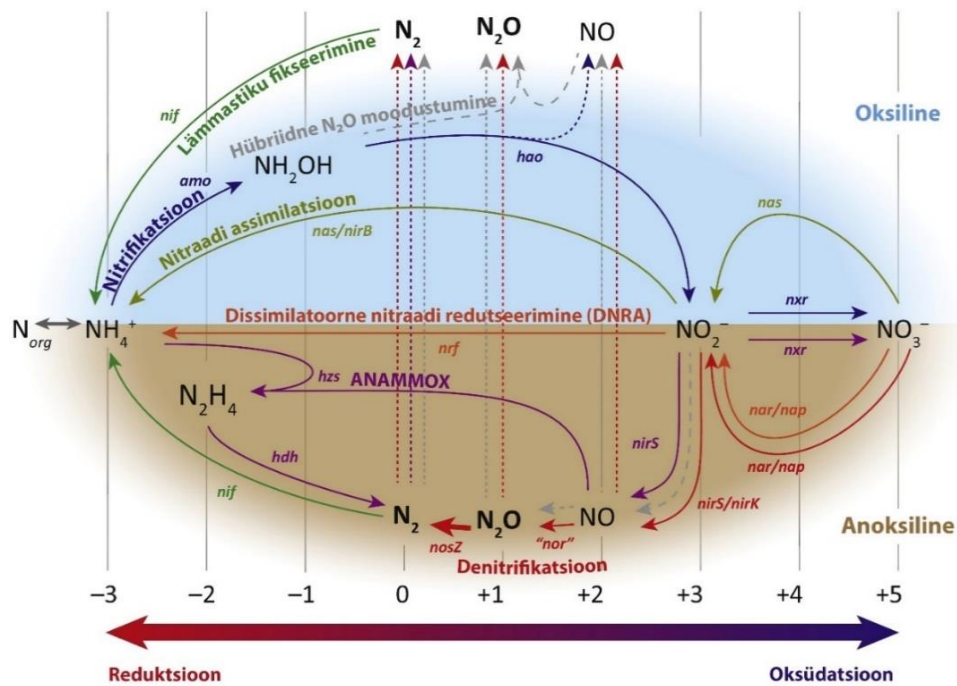
$N_2O$  on enamasti nitrifikatsiooni või denitrifikatsiooni kõrvalsaadus (Hallin *et al.*, 2018; Pärn *et al.*, 2018). Orgaanikarikastes muldades on  $N_2O$  emissioon peamiselt seotud temperatuuri, mullaniiskuse ja nitraadi kontsentratsiooniga (Pärn *et al.*, 2018). Üleujutused mõjutavad  $N_2O$

emisiooni mullast. On leitud, et sügavama põhjaveetasemega muldades esinevad suuremad N<sub>2</sub>O emissioonid (Mander *et al.*, 2015). Seda näitas ka Schindler ja teiste (2020) uuring, kus leiti, et mullaniiskuse suurenedes alaneb N<sub>2</sub>O emissioon. Pärn ja teised (2018) leidsid, et suurimad N<sub>2</sub>O emissioonid esinevad orgaanikarikkast mullast, kui mullaniiskus on umbes 50% ( $\sim 0.5 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$ ). Samuti suurenevad N<sub>2</sub>O vood kas liigniiske mulla kuivendamisel või kuivema mulla niisutamisel (Pärn *et al.*, 2018). N<sub>2</sub>O emissioone võivad mõjutada ka sesoonsed erinevused (Kachenchart *et al.*, 2012). Kachenchart ja teised (2012) leidsid, et suuremad N<sub>2</sub>O emissioonid on seotud märja hooaja ja mullapooride veesisaldusega ning N<sub>2</sub>O emissioon on madalam, kui sademeid ei esine.

Lisaks mullaniiskusele võib metsamullast N<sub>2</sub>O vooge mõjutada ka puuliigi vanus. Mander ja teised (2015) leidsid, et vanema lepike ala, mille mullas oli suurem lämmastiku kontsentratsioon, esines ka suurem N<sub>2</sub>O emissioon kui noorema lepike katsealal. Sarnasele tulemusele jõudsid ka Christiansen ja Gundersen (2011), kes mõõtsid N<sub>2</sub>O vooge tamme- ja kuusemetsa mullast. Nad leidsid, et emissioonid olid suuremad vanemate puudega mullast (Christiansen & Gundersen, 2011). See kinnitab, et N<sub>2</sub>O emissioonid on seotud lämmastiku kättesaadavusega mullast.

### **1.3.2 Lämmastikuringe protsessid ja markergeenid**

Lämmastikuringe on kombinatsioon assimilatsiooni ja dissimilatsiooni protsessidest (Thamdrup, 2012), kus mikroorganismid võivad viia läbi 14 erinevat redoksreaktsiooni ning lämmastiku oksüdatsiooniaste võib muutuda vahemikus  $-3$  ja  $+5$  (joonis 2) (Kuypers *et al.*, 2018). Bioloogiline lämmastiku fikseerimine toimub sümbioosis olles või vabalt elavate mikroorganismide toimetel, kellel on olemas nitrogenaasi ensüüm, millega saab siduda dilämmastikku ammoniaagiks (Kuypers *et al.*, 2018). Nitrogenaasi ensüümi on leitud nii bakteritest kui ka arhedest (Kuypers *et al.*, 2018). Nende keskkonnast tuvastamiseks kasutatakse *nifH* markergeeni (Zehr *et al.*, 2003).



Joonis 2. Lämmastikuringe olulisemad protsessid aeroobses ja anaeroobses keskkonnas (Hallin *et al.*, 2018). Joonisel olevad pidevjooned näitavad mikroobide poolt läbiviidavaid lämmastikuringe protsesse, mille juures on välja toodud vastava protsessi markergeen. Katkendjooned tähistavad võimalike gaasiemissioonide radu.

Nitrifikatsioon ehk  $\text{NH}_4^+$  oksüdeerumine on aeroobne protsess, kus  $\text{NO}_2^-$  kaudu moodustub  $\text{NO}_3^-$  (Koch *et al.*, 2019; Leininger *et al.*, 2006). Nitrifikatsiooni protsessi mullas vahendavad kaks funktsionaalset mikroorganismide rühma (Koch *et al.*, 2019), milleks on ammoniaaki oksüdeerivad bakterid (AOB) ja ammoniaaki oksüdeerivad arhed (AOA) (He *et al.*, 2007). Nende arvukuse uurimine põhineb *amoA* geenidel (He *et al.*, 2007). Nitrifikatsioon võib toimuda ka ühe-etapiliselt, sest hiljuti avastati *Nitrospira* perekonda kuuluvad bakterid, kes on võimelised ammooniumi täielikuks oksüdatsiooniks ehk COMAMMOX-iks (Daims *et al.*, 2015). COMAMMOX toimub eelistatult keskkonnas, kus  $\text{NH}_4^+$  on piiratud kogustes (Kuypers *et al.*, 2018).

Denitrifikatsioon on mitmeetapiline protsess, mille toimumise eeldusteks on orgaanilise aine ja lämmastikoksiidide ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  või  $\text{N}_2\text{O}$ ) olemasolu, samuti anaeroobsed või hapnikuvaesed tingimused koos vastavate ainevahetuslike võimekustega mikroorganismidega (bakterid, arhed ja seened) (Philippot *et al.*, 2007). Denitrifikatsioon algab  $\text{NO}_3^-$  redutseerimisega, mis järk-järgult redutseeritakse  $\text{N}_2$ -ks (Mania *et al.*, 2014), kuigi denitrifitseerijad ei pruugi läbi viia kõiki etappe (Cameron *et al.*, 2013).  $\text{NO}_2^-$  redutseerimist

lämmastikoksiidiks (NO) viiakse läbi kas vaske sisaldava nitriti reduktaasi (kodeerib geen *nirK*) või tsütokroom cd-1 sisaldava nitriti reduktaasi (kodeerib geen *nirS*) abil (Philippot *et al.*, 2007). *nirK* ja *nirS* markergeene kasutatakse NO<sub>2</sub><sup>-</sup> redutseerimisprotsessi markergeenidena (Kuypers *et al.*, 2018) ja tavaliselt nad ühes genoomis koos ei esine, kuid leidub üksikuid erandeid (Graf *et al.*, 2014). Graf ja teised (2014) uurisid *nirK* ja *nirS* koosesinemist ja leidsid, et 652 mikroorganismist esines *nirK* 458 ja *nirS* 110, kusjuures kümnel genoomil (*Gammaproteobacterium* HdN1, *Rhodothermus marinus* ja *Pseudomonas stutzeri* neljal tüvel) esinesid mõlemad *nir* geenid.

Mikroorganismid, kes on võimelised läbi viima denitrifikatsiooni viimast etappi ehk N<sub>2</sub>O redutseerimist N<sub>2</sub>-ks, teevad seda *nosZ* geeni poolt kodeeritud N<sub>2</sub>O reduktaasiga, mida leidub bakterites ja arhedes (Graf *et al.*, 2014; Hallin *et al.*, 2018). N<sub>2</sub>O reduktaasi puhul eristatakse klaadi I ja klaadi II ning on leitud, et neist esimest sisaldavad organismid on suurema tõenäosusega täielikud denitrifitseerijad (Hallin *et al.*, 2018). Samas on täheldatud, et umbes kahel kolmandikul denitrifitseerivatel mikroorganismidel puudub *nosZ* geen ning denitrifikatsiooni protsessi lõppsaaduseks on N<sub>2</sub>O (Jones *et al.*, 2008).

Dissimilatoorse nitraadi redutseerimist ammooniumiks ehk DNRA protsessi peetakse lämmastikku mullas kinni hoidvaks (Mania *et al.*, 2014; Rütting *et al.*, 2011). DNRA toimub, kui mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioon on madal, kuid selles leidub suuretes kogustes orgaanilist ainet (Rütting *et al.*, 2011). Protsessi viivad läbi mikroorganismid (Rütting *et al.*, 2011), kes omavad nitriti reduktaasi kodeerivat geeni *nrfA* (Welsh *et al.*, 2014). Sõltuvalt keskkonnatingimustest võivad DNRA protsessi läbi viivad mikroobid emiteerida redutseerimisprotsessi kõrvalsaadusena N<sub>2</sub>O-d (Mania *et al.*, 2014).

Lämmastikuringe protsess, mis on otseselt seotud ka süsinikuringega, on nitritist sõltuv anaeroobne metaani oksüdeerimine ehk n-damo (Wang *et al.*, 2016). Seda viivad läbi bakterid, kes kuuluvad NC10 hõimkonda, ning nende uurimiseks kasutatakse n-damo spetsiifilist 16S RNA geeni (Ettwig *et al.*, 2009). Neid organisme on leitud enamasti veekeskkondade uuringutes, sest n-damo markergeenide arvukust mõjutab peamiselt mulla üleujutuse kestus ning sealse süsiniku ja lämmastiku (C/N) suhe (Wang *et al.*, 2016).

#### **1.4 Kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon**

Mullas toimuvaid lämmastikuringe protsesse saab hinnata markergeenidega, mille arvukust saab analüüsida keskkonnaproovidest nukleiinhapete (DNA ja RNA) ekstraheerimise ja kvantitatiivse polümeraasahelreaktsiooni (qPCR) meetoditega.

Mullaproovide analüüsis on esimeseks sammuks nukleiinhapete ekstraheerimine (Sharma *et al.*, 2007). Ekstraheerimise esimeses etapis mikroobikooslused lüüsitakse ning seejärel puhastatakse nukleiinhapped teistest raku- ja mullakomponentidest (Sharma *et al.*, 2007). qPCR-iga kvantifitseeritakse DNA-s sisalduva markergeeni hulka spetsiifiliste praimeritega (Head *et al.*, 1998). qPCR-is protsessis toimub arvukalt tsükleid ning igas tsüklis on kolm etappi, kus iga etapp toimub kindlal temperatuuril (VanGuilder *et al.*, 2008). Protsess algab DNA denaturatsiooniga, mille käigus DNA biheeliksid lagunevad üheahelaliseks (Smith & Osborn, 2009). Seejärel seonduvad oligonukleotiidised praimereid DNA ahelatega ning kolmandas etapis toimub DNA süntees, kus seondunud praimerite abil sünteesitakse amplifitseeritava DNA üksikahelate fragmentidele komplementaarsed fragmendid. Selle tulemusena toimub amplikonide arvu eksponentsiaalne kasv (Smith & Osborn, 2009). Amplikonide kasvu tuvastamist reaajas võimaldavad fluorestsentsmärgised, nt märgise SYBR Green DNA-sse sidumisel puhul saadab see välja oluliselt tugevama fluorestsentssignaali kui mitteseotuna (VanGuilder *et al.*, 2008). Amplikonide arv suureneb pärast iga tsükli qPCR-i käigus, kus proportsionaalselt suureneb ka fluorestsentssignaal, mille tulemusena saadakse amplifikatsioonikõver. Ampifikatsioonikõver koosneb kolmest osast: eksponentsiaalne faas, lineaarne faas ja platoo (Karlen *et al.*, 2007). Esimeses faasis on produkti akumulatsioon eksponentsiaalne ning reaktsiooni efektiivsus väga kõrge, kuid seda on taustamürast raske eristada, sest produkti kogus on väike (VanGuilder *et al.*, 2008). Teises osas toimub produktide akumulatsioon lineaarselt. Kolmandas faasis saavutab reaktsioon platoo, sest olulised reaktsioonikomponendid on ammendunud ja produkti amplifitseerimine lõppeb (VanGuilder *et al.*, 2008). Teoreetiliselt kahekordistuks geenikoopiate arv iga tsükli järel qPCR-is, kuid on eksperimentaalselt näidatud, et seda juhtub harva ning seetõttu on qPCR-i efektiivsus tavaliselt ühe (kui amplifikatsiooni ei toimu) ja kahe vahel (Karlen *et al.*, 2007).

qPCR-i andmeid kasutatakse analüüsiks, kui fluorestsentssignaal on taustamürast piisavalt palju kõrgem. Taset, kus fluorestsentssignaal ületab taustamüra, nimetatakse baasjooneks (Kubista *et al.*, 2006). Tsükli arv, mis on vajalik baasjoone ületamiseks, nimetatakse lävitsükliks (CT) ning see on tavaliselt kümnekordne baasjoone standardhälve (Heid *et al.*, 1996). Proovide algekstsentratsioonide arvutamiseks on vaja standardkõveraid, määrata CT väärtus ning arvesse võtta qPCR-i efektiivsust (Karlen *et al.*, 2007; Smith & Osborn, 2009).

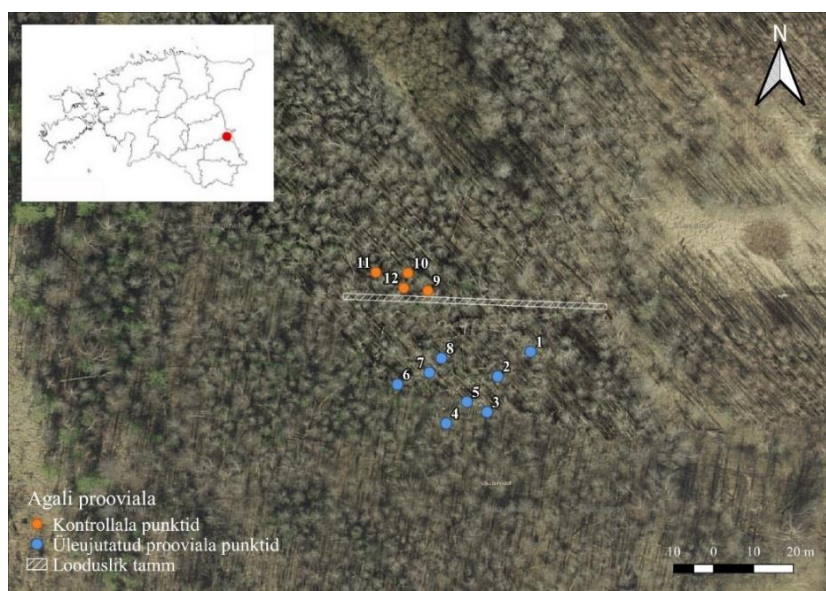


## 2. Metoodika

### 2.1 Prooviala kirjeldus

Prooviala (58° 17' N; 27° 17' E) paikneb tasasel maastikul Ugandi lavamaa ja Peipsi järve vahelisel Peipsiäärsel madalikul ning on Lämmijärve rannajoonest (Liisnõna lahest) u 8 km lääne pool (Maa-ameti..., i.aa) (joonis 3). Ala asub Tartu maakonnas Kastre vallas ning on Agali ja Järvelja küla lähedal. Prooviala pinnakatteks on kvaternaari ajastul ladestunud moreen, milles leidub liivsavi ja saviliiv kive ning rähka (Maa-amet..., i.ab). Uurimisala paikneb gleistunud nõrgalt leetunud (LkIg) ja leostunud (Go) mullal, mille huumushorisondi tüsedus on 18–25 cm (Maa-amet..., i.ab). Lõimises esineb liiva ja alumistes horisontides keskmist liivsavi ja saviliiva (150–120/ls<sub>2</sub>(sl)) (Maa-ameti..., i.ab). Ala keskmine aastane sademete hulk on 650 mm ning keskmine temperatuur on juunis 17 °C ja jaanuaris –6,7 °C (Schindler *et al.*, 2020).

Prooviala kõrgus merepinnast on 36 m (Maa-ameti..., i.aa). Prooviala asub varasemal põllumajandusmaal (Schindler *et al.*, 2020), kus nüüd kasvab umbes 40-aastane hall leplik (*Alnus incana* (L.) Moench). Alustaimestikus domineerivad harilik toomingas (*Prunus padus* (L.)), harilik angervaks (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) ja vaarikad (*Rubus idaeus* (L.)) (Schindler *et al.*, 2020). Seda ala ümbritsevad peamiselt metsad ja põllud ning lähim eramaja on u 200 m kaugusel (Maa-ameti..., i.aa).



Joonis 3. Agali prooviala asukoht ja proovivõtu punktid. Joonisel on siniste ringidega märgitud üleujutatud ja oranžidega kontrollala asukohad. Joonise aluskaardiks on Maa-ameti ortofoto ja joonise tegemiseks on kasutatud tarkvara QGIS 3.12.



## 2.2 Üleujutuskatse ja mullaproovide kogumine

Proovialal tehti üleujutuskatse, kus metsaala jaotati kaheks: kontrollalaks ja üleujutatud alaks (joonis 3). Üleujutatud ala oli  $40 \times 40$  m suurune, kuhu pumbati eksperimendi igal päeval (8–21. august 2017. aastal)  $55\text{--}70\text{ m}^3$  vett. Üleujutatud ala oli kontrollalast ( $20 \times 20$  m) eraldatud ühe meetrise loodusliku tammiga (Schindler *et al.*, 2020).

Proovialalt koguti mullaproovid 2017. aasta suvel ja sügisel ning 2018. aasta augustis. Eksperiment koosnes neljast perioodist. Eksperimendieelsel perioodil (PRE) koguti mullaproovid 25. ja 26. juulil ning 7. augustil. Eksperimendiperioodil (EXP) koguti mullaproovid 16. ja 21. augustil ning eksperimendijärgsel perioodil (POST) koguti mullaproovid 11. ja 12. septembril ning 7. novembril. Viimased mullaproovid võeti 15. augustil 2018. aastal (POSTPOST). Mullaproovid võeti kõikidelt katsealadelt labidaga 0–10 cm sügavuselt leppade vahetust lähedusest ning iga proov pandi eraldi kilekottidesse. Proove säilitati külmkapis ( $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ja sügavkülmas ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kuni vastavate keemiliste või mikrobioloogiliste analüüside läbiviimiseni.

Mullaproovides määrati pH, üldlämmastiku (N%), nitraadi ( $\text{NO}_3^-$ ), ammooniumi ( $\text{NH}_4^+$ ), fosfori (P), kaaliumi (K), kaltsiumi (Ca), magneesiumi (Mg) ja orgaanilise aine sisaldus. Lisaks mõõdeti veetaset, mullaniiskust ja -temperatuuri. Mullast ja puutüvedest mõõdeti  $\text{N}_2\text{O}$  gaasiemissioone. Detailsem kirjeldus keemilistest analüüsides ja gaasiemisioonide mõõtmisest on saadaval Schindler ja teiste (2020) artiklis.

## 2.3 DNA eraldamine

Mullaproovidest DNA ekstraheerimiseks kasutati PowerSoil® DNA Isolation Kit'i (Qiagen, USA), mille kasutamisel järgiti tootja protokoll. Proove homogeniseeriti 20 sekundit 5000 pööret minutis homogenisaatoriga Precellys 24 (Bertin Technologies SAS, Prantsusmaa). DNA kogust ja kvaliteeti kontrolliti Tecan Infinite M200 (Tecan Trading AG, Šveitsi) ning eraldatud DNA säilitati  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  juures.

## 2.4 Geenikoopiate arvukuse määramine mullaproovidest qPCR meetodil

Bakterite ja arhede arvukusi hinnati 16S rRNA abil. Lämmastikuringe protsesside geneetilise potentsiaali hindamiseks kasutati järgnevaid markergeene: *nirS*, *nirK*, *nosZ* klaad I ja *nosZ* klaad II (denitrifikatsioon), bakterite ja arhede *amoA* (nitrifikatsioon), COMAMMOX *amoA* (COMAMMOX), *nrfA* (DNRA), *nifH* (lämmastiku fikseerimine) ja *n-damo* spetsiifiline 16S

rRNA. Geenikoopiate arvukusi määrati qPCR meetodi abil ja selleks kasutati termotsüklerit Rotor-Gene Q (Qiagen, USA).

Märklaudgeenide praimereid, praimerite kontsentratsioonid ja qPCR programmid on välja toodud tabelis 1. Proovide analüüsimiseks tehti reaktsioonisegu, mis sisaldas 5 µl Maxima SYBR Green Master (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) reagenti, päri- ja vastassuunalist praimerit, 1 µl eraldatud proovi DNA-d ja ülejäänud koguses vett. Reaktsioonisegu koguseks oli kõigil juhtudel 10 µl. Mõõtmised qPCR-iga tehti iga proovi korral kolmes korduses ja igal mõõtmisel kasutati ka negatiivseid kontrollproove.

Proovide esmaseks töötluks kasutati Rotor-Gene Series Software v 2.0.2 tarkvara, kus analüüsiti proovide amplifikatsioonikõveraid. Seejärel kasutati programmi LinReg PCR v 2020.0, et leida proovide individuaalsed amplifikatsiooniefektiivsused. Erinevuste tõttu efektiivsustes jagati proovid seitsmeks amplikoniks proovivõtu aegade alusel. Geenikoopiate arvukused arvutati kasutades iga markergeeni vastavat standardkõverat. Geenikoopiate arv esitati geeni koopiate arv ühe grammi kuivaine (koopiat/gKA) kohta.

Tabel 1. Uurimistöös kasutatud praimerid ja qPCR programmid.

Märklaudgeen	Praimer	Viide	Praimeri kontsentratsioon (µM)	qPCR programm
Bakterite 16 rRNA	Bact517F	Liu <i>et al.</i> , 2007	0,6	95 °C 10 min; 35 tsüklit: 95 °C 30 s; 60 °C 45 s; 72 °C 45 s
	Bact1028R	Huse <i>et al.</i> , 2008		
Arhede 16S rRNA	Arc519F	Espenberg <i>et al.</i> , 2016	0,6	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 56 °C 30 s; 72 °C 30 s
	Arch910R			
<i>nirS</i>	nirSCd3af	Kanter <i>et al.</i> , 2016	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 55 °C 30 s; 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	nirSR3cd			
<i>nirK</i>	nirK876	Hallin & Lindgren, 1999	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s; 58 °C 30 s; 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	nirK1040			
<i>nosZI</i>	nosZ2F	Henry <i>et al.</i> , 2006	0,6	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	nosZ2R			
<i>nosZII</i>	nosZ-II-F	Jones <i>et al.</i> , 2013	0,6	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 54 °C 45 s, 72 °C 45 s, 80 °C 45 s
	nosZ-II-R			
<i>nifH</i>	Ueda19F	Ueda <i>et al.</i> , 1995	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 53 °C 45 s, 72 °C 45 s
	Ueda407R			
<i>nrfA</i>	6RF	Takeuchi, 2006	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s
	6R			
Bakterite <i>amoA</i>	amoA-1F	Rotthauwe <i>et al.</i> , 1997	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 45 s
	amoA-2R			
Arhede <i>amoA</i>	CrenamoA 23F	Tourna <i>et al.</i> , 2008	0,8	95 °C 10 min; 45 tsüklit: 95 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 45 s
	CrenamoA 616R			
COMAMMOX <i>amoA</i>	comamoA AF	Wang <i>et al.</i> , 2018	0,8	95 °C 10 min; 40 tsüklit: 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s
	comamoA SR			
n-damo 16 rRNA	pq2F	Ettwig <i>et al.</i> , 2009	0,8	95 °C 10 min, 45 tsüklit: 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 80 °C 30 s
	pq2R			

## 2.5 Andmeanalüüs ja autori osalus

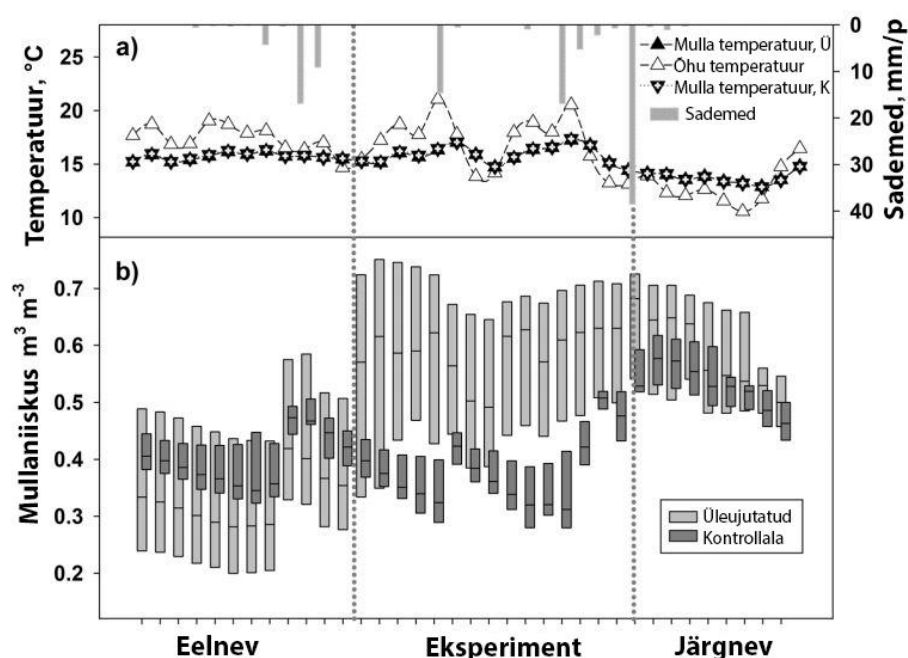
Andmeanalüüsiks kasutati statistikaprogrammi „STATISTICA 7.1“. Füüsikalis-keemiliste ja geeniparameetrite erinevusi analüüsiti ühefaktorilise dispersioonianalüüsi (*one-way* ANOVA) või t-testiga, millega tuvastati statistiliselt olulisi erinevusi erinevate gruppide vahel. Keskkonnaparameetrite ja geeniparameetrite seoste olemasolu ja olulisuse hindamiseks kasutati Spearman'i korrelatsioonikoefitsienti. Jooniste tegemiseks kasutati programme „R version 4.0.3“ ja „RStudio 1.4.1103“.

Bakalauseusetöö autor määras markergeenide arvukused qPCR meetodiga (va bakterite ja arhede 16S rRNA, *nosZI* ja *nosZII*). Autor arvutas markergeenide arvukused ning tegi andmetöötluse ja -analüüsi.

### 3. Tulemused

#### 3.1 Prooviala füüsikalis-keemilised parameetrid

Proovialade õhutemperatuur, sademed, mullatemperatuur ja -niiskus uurimisperioodi erinevatel aegadel on näidatud joonisel 4. Õhutemperatuur oli uurimisperioodil vahemikus  $17,4 \pm 4,4$  °C ja mullatemperatuur oli proovialadel vahemikus  $14,3 \pm 4,0$  °C. Olulisi erinevusi mullatemperatuuris proovialade vahel ei esinenud. Mullaniiskus varieerus uurimisperioodil keskmiselt vahemikus  $0,47 \pm 0,19$  m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>. Eksperimendi ajal oli mullaniiskus statistiliselt kõrgem üleujutatud alal kui kontrollalal ( $p < 0,01$ ). Mullaniiskus oli mõjutatud proovialadel ka sademete poolt, eriti intensiivselt sadas neljal korral ( $>15$  mm/p). Täpsemalt on mõõdetud temperatuuride ja mullaniiskuste väärtused näidanud Schindler *et al.* 2020.



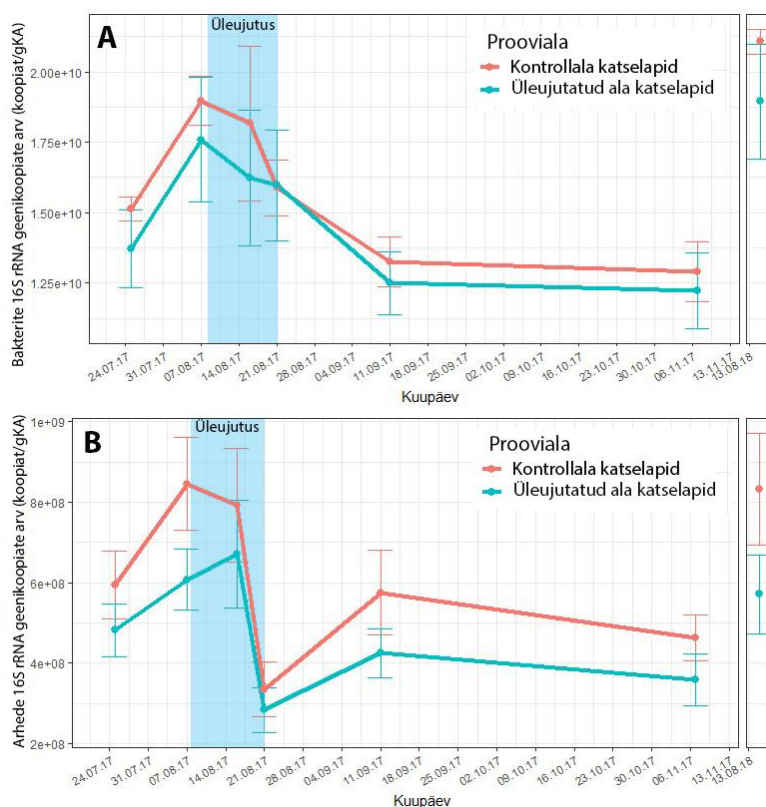
Joonis 4. Uurimisperioodil mõõdetud proovialade mullatemperatuur, õhutemperatuur, sademed ja mullaniiskus (Schindler *et al.* 2020).

Mullaproovide keskmised  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , P, K, Ca ja Mg kontsentratsioonid varieerusid vastavalt vahemikus  $1,7 \pm 1,6$  mg N kg<sup>-1</sup>,  $2,1 \pm 0,9$  mg N kg<sup>-1</sup>,  $15,7 \pm 1,8$  mg/kg,  $39,3 \pm 9,6$  mg/kg,  $1852,1 \pm 174,5$  mg/kg ja  $352,1 \pm 56,4$  mg/kg. Enne üleujutust erines statistiliselt mullaproovide K ja Ca kontsentratsioonid katsealade vahel, kus kõrgemad kontsentratsioonid esinesid kontrollalal (mõlema puhul  $p < 0,05$ ). Eksperimendi ajal erines oluliselt Ca kontsentratsioon, mis oli kõrgem kontrollalal ( $p < 0,05$ ). Pärast üleujutust olid K, Ca ja Mg kontsentratsioonid statistiliselt erinevad alade vahel (kõigil vastavalt  $p < 0,05$ ). Mulla  $\text{NH}_4^+$

kontsentratsioonid üleujutuse ajal suurenesid ning peale üleujutust täheldati oluline erinevus kontrollala ja katseala vahel ( $p < 0,05$ ). Lisaks täheldati üleujutatud alal mulla  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooni olulist langemist üleujutuse ajal ( $p < 0,001$ ). Määratud keemiaparameetreid on kirjeldanud ka Schindler ja teised (2020).

### 3.2 Bakterite ja arhede markergeenid

Bakterite 16S rRNA arvukus varieerus mõlemal katsealal vahemikus  $1,6 \times 10^{10} \pm 4,9 \times 10^9$  koopiat/gKA (joonis 5A). Üleujutuse järgne periood kontrollalal erines statistiliselt oluliselt üleujutuse eelsest ja üleujutuse perioodist (mõlema puhul  $p < 0,05$ ), kuid üleujutatud alal statistiliselt olulised erinevused geenikoopiate arvukuste vahel puudusid. Sellest võib järeldada, et üleujutus mõjutas bakterite arvukust, sest varasemad erinevused kadusid, kuid bakterite arvukus ei muutunud statistiliselt oluliselt üleujutatud alal.



Joonis 5. Bakterite 16S rRNA (A) ja arhede 16S rRNA (B) geenikoopiate arvukuste muutus koos standardveaga uurimisperiodil. Sinise joonega on tähistatud üleujutatud ala ja punase joonega kontrollala geenikoopiate arvukuse muutus. Helesinine värvitud ala joonisel tähistab üleujutuse perioodi.

Agali prooviala arhede 16S rRNA arvukus varieerus katsealadel keskmiselt vahemikus  $5,4 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^8$  koopiat/gKA (joonis 5B). Statistilist olulisi erinevusi katsealade ja

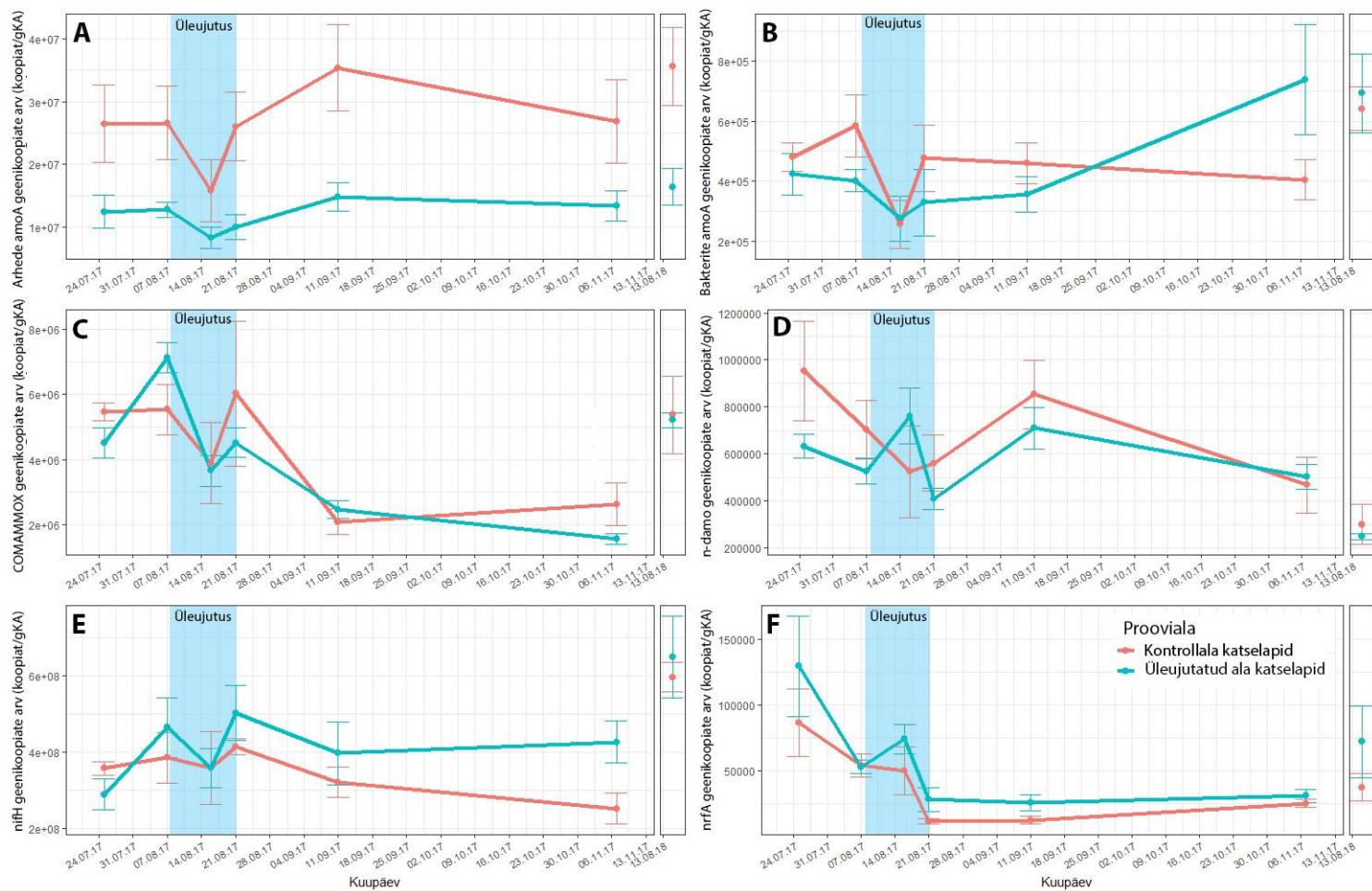
erinevate ajaperioodide vahel ei leitud, millest võib järeldada, et üleujutus ei vähendanud statistiliselt oluliselt arhede 16S rRNA arvukust.

Aasta hiljem võetud proovide bakterite 16S rRNA arvukus oli katselappidel võrreldes eksperimendi ajal võetud proovidega mõnevõrra suurem, aga arhede 16S rRNA arvukused olid mõlemal aastal augusti keskpaigas sarnasel tasemel.

### 3.3 Lämmastikuringe markergeenid

Arhede *amoA* arvukus varieerus katsealadel keskmiselt vahemikus  $1,8 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$  koopiat/gKA (joonis 6A). Üleujutatud alal leiti arhede *amoA* arvukustes statistiliselt oluline erinevus eksperimendi ja üleujutusjärgse perioodi vahel ( $p < 0,05$ ), kus arhede *amoA* geenikoopiate arvukus tõusis statistiliselt oluliselt. Kuna kontrollala ja üleujutatud ala erinesid sarnaselt ja statistiliselt oluliselt igal ajaperioodil, siis üleujutuse mõju arhede *amoA* arvukusele oli väike. Bakterite *amoA* keskmine arvukus mõlemal katsealal kogu uurimisperioodi jooksul oli  $4,6 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^5$  koopiat/gKA ja arvukus oli suurim üleujutuse järgsel perioodil üleujutatud alal (joonis 6B). Bakterite *amoA* arvukus ei erinenud statistiliselt oluliselt katsealade vahel. COMAMMOX *amoA* arvukus oli mõlemal katsealal uurimisperioodi ajal keskmiselt vahemikus  $4,3 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$  koopiat/gKA (joonis 6C). Katsealal langes COMAMMOX *amoA* arvukus üleujutuse ajal ja see erines statistiliselt oluliselt üleujutuse eelsest ja üleujutuse järgsest perioodist (vastavalt  $p < 0,05$  ja  $p < 0,001$ ), mil arvukus langes veelgi.

*n-damo* arvukus varieerus katsealadel uurimisperioodil keskmiselt vahemikus  $5,7 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$  koopiat/gKA (joonis 6D). Kontrollala ja üleujutatud ala vahel leiti statistiliselt oluline erinevus enne üleujutuskatset ( $p < 0,05$ ). Statistilised erinevused alade vahel kadusid üleujutuse ajal ja sellele järgneval perioodil ning seega oli üleujutusel mõju *n-damo* geenikoopiate arvukusele. *nifH* markergeeni keskmine arvukus katsealadel oli vahemikus  $4,2 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^8$  koopiat/gKA (joonis 6E). *nifH* markergeeni arvukuses statistiliselt olulist üleujutuse mõju ei tuvastatud. *nrfA* geenikoopiate arvukus varieerus mõlemal katsealal uurimisperioodi jooksul keskmiselt  $5,2 \times 10^4 \pm 5,4 \times 10^4$  koopiat/gKA (joonis 6F). Üleujutatud ja kontrollalal erines *nrfA* geenikoopiate arvukus enne üleujutust statistiliselt oluliselt üleujutuse järgsest perioodist (mõlema puhul  $p < 0,05$ ). Võrreldes kontrollalaga puudus üleujutatud alal statistiliselt oluline erinevus üleujutuse eelse ja üleujutusperioodi vahel.

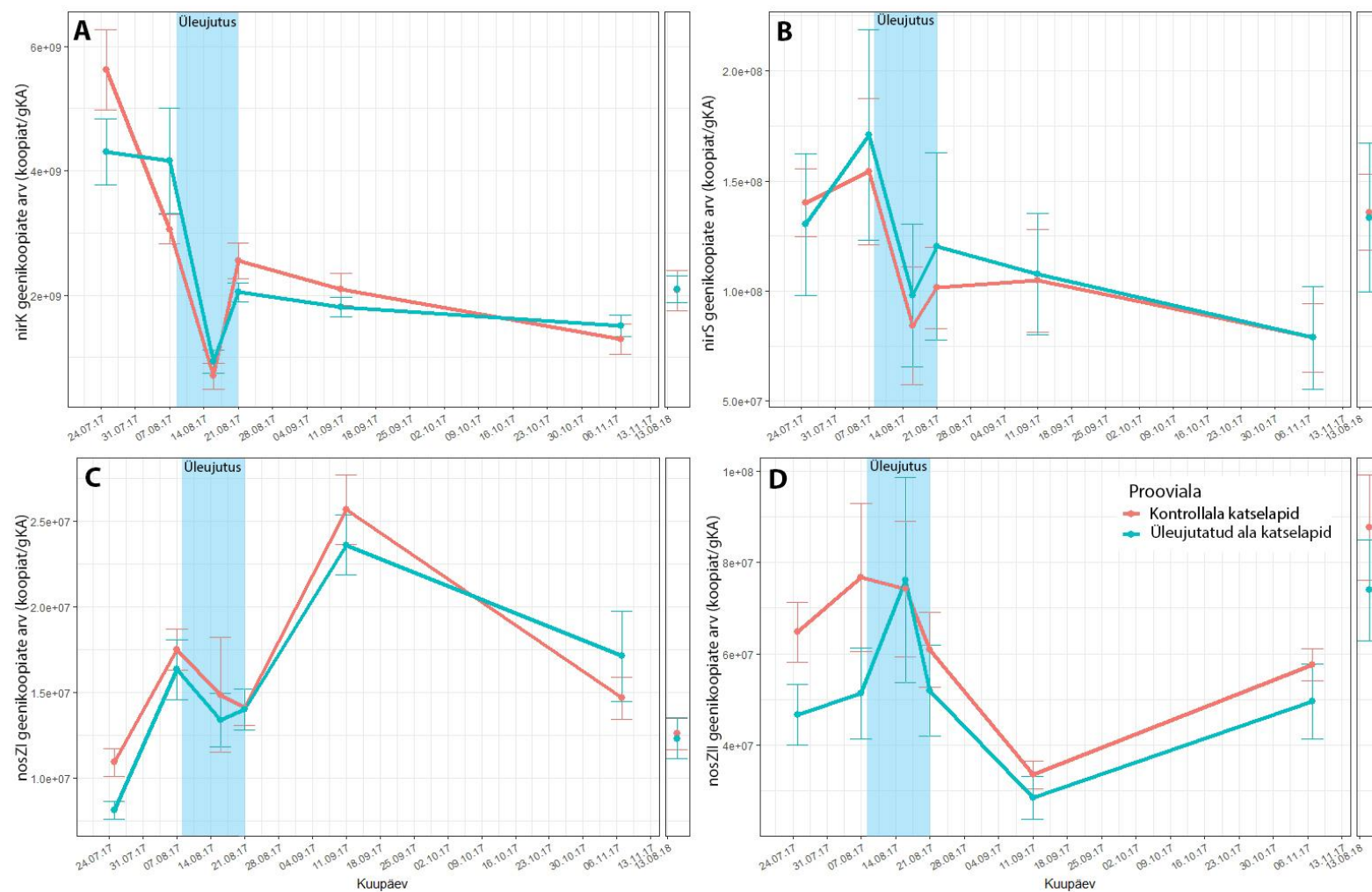


Joonis 6. Nitrifikatsiooni, n-damo, N<sub>2</sub> fikseerimise ja DNRA markergeenide geenikoopiate arvukuse muutus koos standardveaga uurimisperioodil: arhede *amoA* (A), bakterite *amoA* (B), COMAMMOX *amoA* (C), n-damo spetsiifiline 16S rRNA (D), *nifH* (E) ja *nrfA* (F) geen. Sinise joonega on tähistatud üleujutatud ala ja punase joonega kontrollala geenikoopiate arvukuse muutus. Helesinine värvitud ala joonisel tähistab üleujutuse perioodi.



Dentitifikatsiooni geenikoopiate arvukuse muutused ajas on esitatud joonisel 7. *nirK* keskmine arvukus katsealadel varieerus  $2,4 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$  koopiat/gKA ja *nirS* vahemikus  $1,2 \times 10^8 \pm 8,4 \times 10^7$  koopiat/gKA. *nirK* arvukust üleujutus statistiliselt oluliselt ei mõjutanud. *nirS* arvukus erines statistiliselt oluliselt kontrollalal enne ja pärast üleujutust ( $p < 0,05$ ), kuid üleujutatud alal sarnast erinevust ei leitud. *nosZI* geenikoopiate arvukus oli uurimisperioodil katsealade lõikes keskmiselt  $1,5 \times 10^7 \pm 6,0 \times 10^6$  ja *nosZII*  $5,8 \times 10^7 \pm 3,2 \times 10^7$  koopiat/gKA. Üleujutatud alal esines statistiliselt oluline erinevus üleujutusjärgse ning üleujutuseelse ( $p < 0,001$ ) ja üleujutuskatse ( $p < 0,05$ ) ajal mõõdetud *nosZI* geenikoopiate arvukuste vahel, aga kontrollalal neid statistilisi erinevusi ei ilmnenud. Kontrollala ja katseala *nosZII* geenikoopiate arvukus erines statistiliselt oluliselt enne üleujutust ( $p < 0,05$ ). Statistiliselt olulised erinevused alade vahel kadusid üleujutuse ajal ja sellele järgneval perioodil. Üleujutusel oli järelikult oluline mõju *nosZII* geenikoopia arvukuse muutustele eksperimendi ajal, mil arvukus tõusis ja sellele järgneval perioodil, mil arvukus langes.

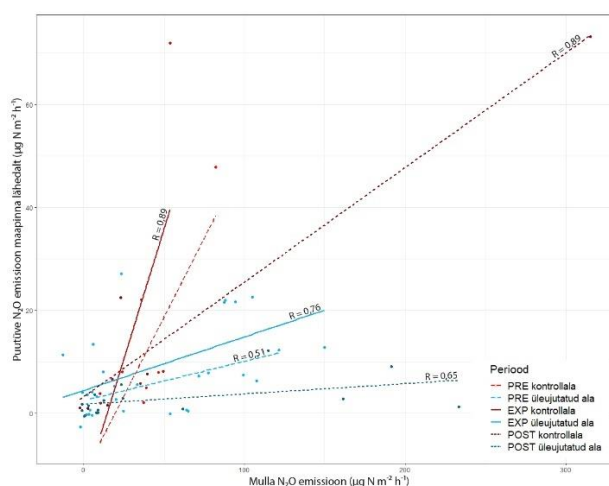
2018. aasta augusti oli bakterite ja arhede *amoA*, COMAMMOX *amoA*, *nifH*, *nirK* ning *nirS* markergeenide arvukus suurem kui 2017. aasta augustis mõõdetud arvukused. *n-damo* ja *nosZI* geenikoopiate arv oli aasta hiljem madalam, kui uurimisperioodil täheldati. *nosZII* ja *nrfA* arvukused oli aasta hiljem sarnasel tasemel kui varem.



Joonis 7. Denitrifikatsiooni markergeenide geenikoopiate arvukuse muutus koos standardveaga uurimisperioodil: *nirK* (A), *nirS* (B), *nosZI* (C) ja *nosZII* (D) geen. Sinise joonega on tähistatud üleujutatud ala ja punase joonega kontrollala geenikoopiate arvukuse muutus. Helesinine värvitud ala joonisel tähistab üleujutuse perioodi.

### 3.4 Dilämmastikoksiidi emissioonid mullast ja puutüvedest

Mulla ja puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide muutused on esitatud lisas 1. Mulla N<sub>2</sub>O emissioonid varieerusid proovialadel vahemikus -12,9 kuni 315,4 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> ning keskmine emissioon üleujutatud alal oli 41,1 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> ja kontrollalal 33,9 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>. Mulla N<sub>2</sub>O emissioonid kontrollala ja üleujutatud ala vahel statistiliselt oluliselt ei erinenud ning üleujutuse mõju mulla N<sub>2</sub>O emissioonidele ei tuvastatud. Keskmine N<sub>2</sub>O voog puutüvedest oli eksperimendi igal ajaperioodil suurim maapinna lähedal ning madalaim 170 cm kõrgusel. Puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonid ei erinenud katsealade vahel statistiliselt oluliselt enne üleujutust ja üleujutuse ajal. Üleujutatud alal tõusis puutüvede maapinnalähedane keskmine N<sub>2</sub>O emissioon (8,2 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) üleujutuse ajal ja pärast üleujutuskatset N<sub>2</sub>O emissioon langes (2,8 µg N m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) (lisa 1B). Kontrollala ja üleujutatud ala maapinnalähedane puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonid erinesid statistiliselt oluliselt pärast üleujutuskatset (p<0,05), kus madalamad emissioonid esinesid üleujutatud alal. Mõõdetud N<sub>2</sub>O emissioonide väärtuseid mullast ja puutüvedest on näidanud ka Schindler *et al.* 2020. Joonisel 8 on näidatud mulla ja maapinnalähedase puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide vaheline seos uurimisperiodil ja need olid kõigil puhkudel positiivsed.

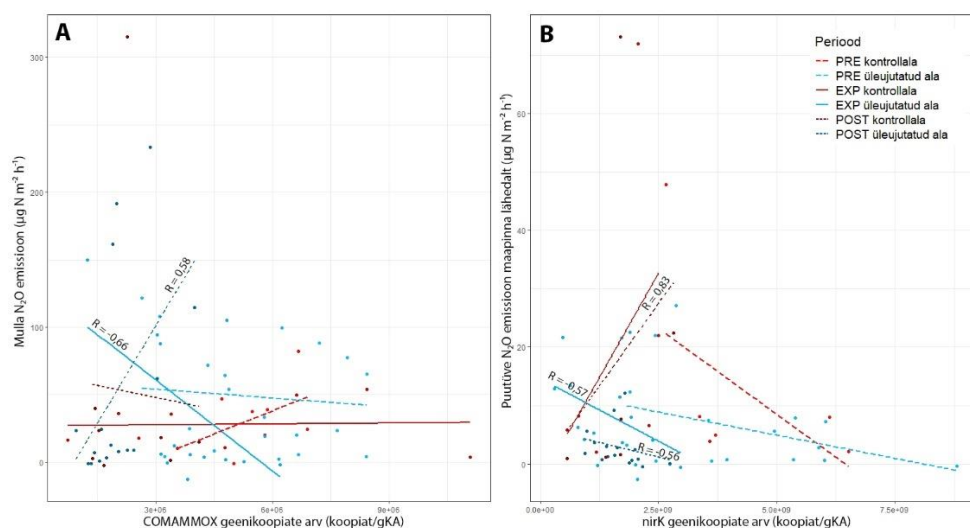


Joonis 8. Puutüvede N<sub>2</sub>O emissioon maapinna lähedalt ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vaheline seos. Joonisel on siniste toonidega esitatud üleujutatud alade ja punaste toonidega kontrollalade vahelised seosed. PRE tähistab üleujutuse eelset perioodi, EXP üleujutuse perioodi ja POST üleujutuse järgset perioodi. Statistiliselt oluliste seoste korral on joonele märgitud Spearmani korrelatsioonikordaja R.

Statistiliselt olulised seosed mulla ja puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide ning markergeenide arvukuste vahel on esitatud lisas 2. Bakterite 16S rRNA arvukus mõjutas negatiivselt mulla

N<sub>2</sub>O emissiooni üleujutatud ala igal ajaperioodil, kuid kontrollalal sarnast negatiivset seost ei tuvastatud. Erinevalt bakteritest ei tuvastatud üleujutatud alal olulist seost arhede 16S rRNA arvukuse ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel ning leiti, et nende vahel esines oluline negatiivne seos vaid kontrollalal üleujutuse ajal. Bakterite 16S rRNA arvukuse ja puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide vahel leiti oluline negatiivne seos üleujutatud alal maapinnalähedalt mõõdetud ja 170 cm kõrguselt mõõdetud N<sub>2</sub>O emissiooni vahel üleujutuse ajal. Lisaks säilis negatiivne seos maapinnalähedal ka pärast üleujutust. Kontrollalal esines bakterite arvukuse ja N<sub>2</sub>O emissioonide vahel oluline negatiivne seos vaid üleujutuse perioodil maapinna lähedal mõõdetud puutüve N<sub>2</sub>O emissiooniga. Arhede ja maapinnalähedalt mõõdetud puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide vahel esines oluline negatiivne seos üleujutatud katselappidel kogu uurimisperioodi jooksul ning kontrollalal leiti oluline negatiivne seos üleujutuse ajal.

Üleujutatud alal esines bakterite ja arhede *amoA* arvukuste ning mulla N<sub>2</sub>O vahel negatiivne seos üleujutuse ajal. Bakterite *amoA* arvukus pärssis mulla N<sub>2</sub>O emissiooni oluliselt ka pärast üleujutust. Kontrollalal sarnaseid olulisi seoseid ei olnud. Üleujutatud alal mõjutas mulla N<sub>2</sub>O emissiooni negatiivselt ka COMAMMOX *amoA* geenikoopiate arvukus lühiajalise üleujutuse ajal, kuid pärast üleujutust leiti nende vahel positiivne seos (joonis 9A). COMAMMOX *amoA* geenikoopiate arvukus oli üleujutuse ajal negatiivselt seotud ka üleujutatud ala igalt kõrguselt mõõdetud puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonidega. Kontrollalal ei leitud ühtegi olulist seost COMAMMOX markergeenide arvukuste ja N<sub>2</sub>O emissioonide vahel.



Joonis 9. COMAMMOX *amoA* geenikoopiate arvukuste ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahelised seosed (A) ning *nirK* geenikoopiate arvukuste ja puutüve N<sub>2</sub>O emissiooni vahelised seosed (B). Spearmani korrelatsioonikoefitsendiga R on näidatud statistiliselt olulised seosed. PRE – üleujutuse eelne periood, EXP – üleujutuse periood, POST – üleujutuse järgne periood.

Üleujutatud alal oli *nifH* arvukus seotud negatiivselt mulla N<sub>2</sub>O ja maapinnalähedase puutüve N<sub>2</sub>O emissiooniga üleujutuse ajal. Samas peale üleujutust leiti negatiivne seos *nifH* arvukuse ja 80 cm kõrguselt mõõdetud puutüve N<sub>2</sub>O emissiooni vahel. Samal kõrgusel leiti aga pärast üleujutust positiivne seos n-damo arvukuse ja puutüve N<sub>2</sub>O emissiooni vahel. n-damo ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel esines samuti positiivne seos pärast üleujutust mõlemal katsealal.

*nrfA* markergeenide arvukus oli üleujutatud alal positiivselt seotud puutüve 170 cm kõrguselt mõõdetud N<sub>2</sub>O emissiooniga ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooniga üleujutuse ajal. *nrfA* markergeenide arvukus oli negatiivselt seotud vaid mulla N<sub>2</sub>O emissiooniga kontrollalal pärast üleujutuskatset.

Üleujutatud alal leiti denitrifikatsiooni markergeenide (*nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII*) arvukuse ning maapinnalähedalt mõõdetud puutüve ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel oluline negatiivne seos. Kontrollalal leiti samade parameetrite vahel oluline negatiivne seos vaid *nosZII* ja maapinnalähedase puutüve N<sub>2</sub>O emissiooni vahel. Üleujutatud alal oli mulla N<sub>2</sub>O emissioon pärast üleujutust denitrifikatsiooni markergeenidest negatiivselt seotud vaid *nosZII* arvukusega ning oluline negatiivne seos maapinnalähedase puutüve N<sub>2</sub>O emissiooniga säilis *nirK*, *nirS* ja *nosZII* geenidel. Samas kontrollalal leiti *nirK* ja *nosZI* ning maapinnalähedase puutüve N<sub>2</sub>O emissiooni vahel oluline positiivne seos. Joonisel 8B on esitatud *nirK* geenikoopiate arvukuse ja puutüve maapinnalähedase N<sub>2</sub>O emissiooni vahelised seosed erinevatel katseaegadel.

### **3.5 Markergeenide ja keskkonnaparameetrite vahelised seosed**

Statistiliselt olulised seosed geenikoopiate arvukuste ja keskkonnaparameetrite vahel on esitatud lisas 3 ja 4. Bakterite 16S rRNA arvukus oli positiivselt seotud üldlämmastiku, pH, P, Ca, Mg ja orgaanilise aine kontsentratsiooniga üleujutatud ala igal ajaperioodil. Samas kontrollalal orgaaniline aine ei mõjutanud bakterite arvukust ning eelnevalt mainitud keemiliste parameetritega ei esinenud olulist seost enne üleujutust. Üleujutatud alal mõjutas mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioon bakterite arvukust negatiivselt enne üleujutust. Samas kontrollalal mõjutas mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioon arhede arvukust negatiivselt üleujutuse ajal. Lisaks leiti kontrollalal enne üleujutuskatset, et NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kontsentratsiooni suurenemine mullas püsib bakterite arvukust, kuid sarnast seost ei esinenud üleujutatud alal. Arhede 16S rRNA markergeenide ning pH, Ca ja Mg vahel esines oluline positiivne seos üleujutatud ala igal perioodil. Kontrollalal oli arhede 16S rRNA oluliselt seotud Mg ja Ca kontsentratsiooniga

vaid enne üleujutuskatselt. Bakterite ja arhede geenikoopiate ning mullaniiskuse vahel ei leitud olulist seost.

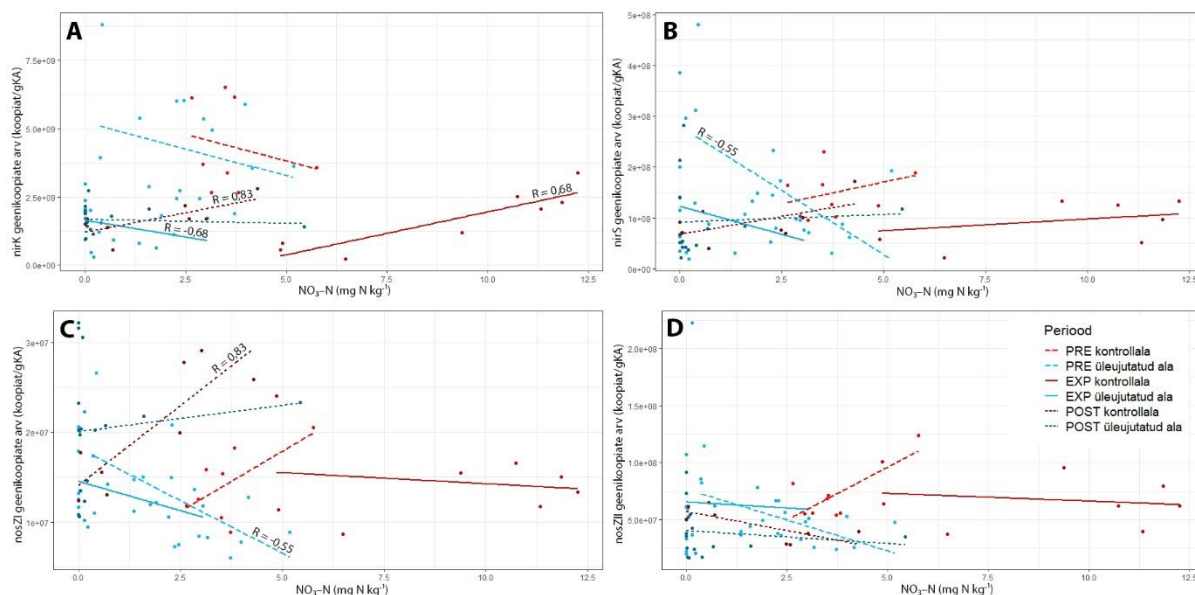
Arhede *amoA* markergeenide arvukus oli positiivselt seotud pH-ga üleujutatud alal igal ajaperioodil ning kontrollalal enne üleujutust ja üleujutuse ajal. Bakterite *amoA* arvukust mõjutas positiivelt pH vaid üleujutatud alal üleujutuse ajal. Bakterite ja arhede *amoA* geenikoopiad olid üleujutatud alal positiivselt seotud ka Ca kontsentratsiooniga üleujutuse ajal ning Mg sisaldusega pärast üleujutust. Kontrollalal oli arhede *amoA* seotud Ca kontsentratsiooniga vaid üleujutuse ajal. Lisaks esines arhede *amoA* geenikoopial tugev positiivne seos mullaniiskusega (kontrollalal pärast üleujutuskatset). COMAMMOX *amoA* arvukust mõjutas üleujutatud alal positiivselt pH ja Ca kontsentratsiooni suurenemine üleujutuse käigus. Pärast üleujutust esines positiivne seos  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooniga ning negatiivne seos  $\text{NH}_4^+$  ja P sisaldusega. Kontrollalal ei esinenud ühtegi olulist seost keskkonnaparameetrite ja COMAMMOX *amoA* arvukuse vahel.

*nifH* geenikoopiate arvukus suurenes üldlämmastiku ja orgaanilise aine suurenedes üleujutatud alal igal ajaperioodil. Samas oli *nifH* arvukus negatiivselt seotud üleujutatud alal enne üleujutuskatset  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooniga. Lisaks ei leitud kontrollalal ühetegi olulist seost *nifH* geenikoopiate arvukuse ja keskkonnaparameetrite vahel.

Üleujutatud alal esines positiivne seos n-damo spetsiifilise 16S rRNA geenikoopiate arvukuse ja  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooni vahel üleujutuse ajal ning kontrollalal pärast üleujutuskatset. See-eest pärssis nende geenikoopiate arvukust kontrollalal pärast üleujutuskatset  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioon. Vastupidiselt n-damo geenikoopiate arvukusele mõjutas  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsioon kontrollalal pärast üleujutuskatset *nrfA* geenikoopiate arvukust negatiivselt ja  $\text{NH}_4^+$  positiivselt. Üleujutatud alal *nrfA* geenikoopiate arvukuse ning  $\text{NO}_3^-$  ja  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioonide vahel olulisi seoseid ei leitud.

*nirS* ja *nosZII* geenikoopiate arvukusel oli positiivne seos pH, Mg, Ca ja üldlämmastikuga üleujutatud alal igal ajaperioodil. Lisaks esines positiivne seos mõlemal markergeenil pH ja üldlämmastikuga ka kontrollalal enne üleujutust. Üldlämmastiku ja pH kontsentratsioon mõjutas positiivselt ka *nosZI* geenikoopiate arvukust üleujutatud alal üleujutuse ajal. *nirK*, *nirS* ja *nosZII* geenikoopiate arvukust mõjutas positiivselt enne üleujutuskatset ka orgaanilise aine kontsentratsioon, aga *nosZII* puhul esines see seos mõlemal katsealal. Kontrollalal leiti aga tugev negatiivne seos *nosZI* arvukuse ja  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsiooni vahel enne ja pärast üleujutuskatset ning  $\text{NH}_4^+$  ja *nirK* vahel pärast üleujutust. Denitrifikatsiooni markergeenide ja  $\text{NO}_3^-$  vahelisi seoseid on võimalik näha joonisel 10. *nirK* ja  $\text{NO}_3^-$  vahel esines tugev

positiivne seos kontrollalal üleujutuse ajal ja pärast üleujutust. Samas esines oluline negatiivne seos üleujutatud alal üleujutuse ajal. *nirK* arvukust mõjutas mõlemal katsealal negatiivselt üleujutuse ajal ka mullatemperatuur.



Joonis 10. Denitrifikatsiooni geenikoopiate arvukuste ja mulla  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooni vahelised seosed: *nirK* (A), *nirS* (B), *nosZI* (C) ja *nosZII* (D). PRE tähistab üleujutuse eelset perioodi, EXP üleujutuse perioodi ja POST üleujutuse järgset perioodi. Spearmani korrelatsioonikoefitsient R on näidatud statistiliselt oluliste seoste puhul.

Katsealadel esines nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) ja denitrifikatsiooni markergeenide (*nirK* ja *nirS*) geenikoopiate vahel igal ajaperioodil positiivne seos ning statistiliselt olulised seosed leiti üleujutatud alal üleujutuse ajal (lisa 5A). Lisaks oli antud markergeenide suhte ja  $\text{NO}_3^-$  vahel oluline positiivne seos üleujutatud alal üleujutuse ajal (lisa 5B). Samal ajaperioodil oli kontrollalal nende vahel oluline negatiivne seos.

## 4. Arutelu

Kaldaäärsed piirkonnad on maismaa ja veeliste ökosüsteemide üleminekualad, kus on üldiselt kõrge toitainete ringlus ning tootlikkus (Naiman *et al.*, 1998). Kaldaäärsed metsad pakuvad olulisi ökoloogilisi teenuseid nagu veekvaliteedi parandamine ja  $\text{NO}_3^-$  eemaldamine mikroobsete protsesside teel (Luke *et al.*, 2007). Häiringud veetasemes muutuste näol mõjutavad kaldaäärsete metsade mikrobioloogilisi aineringeid, k.a. lämmastikuringe, ja metsade puhverdamisvõimet (Hefting *et al.*, 2004; Luke *et al.*, 2007). Antud bakalaureusetöös uuriti, kuidas mõjutab lühiajaline üleujutus lämmastikuringe mikroorganismide arvukust ning sellest tulenevalt mikrobioloogilisi protsesse kaldaäärses lepikus. Lisaks võrreldi geenikoopiate arvukuste muutusi mulla ja puutüvede  $\text{N}_2\text{O}$  emissioonidega.

Uurimisaladel esines mikroorganismidest baktereid rohkem kui arhesid. Arhede arvukust üleujutus oluliselt ei mõjutanud, kuid lühiajalisel üleujutusel oli oluline mõju bakterite arvukusele, nimelt oli nende arvukuse kõikumise diapaseon väiksem. Lisaks on näidatud, et bakterite kooslusi mõjutab enamasti mulla pH, P ja mullaniiskus (Preem *et al.*, 2012). Seos esimese kahega oli ka bakalaureusetöö uuringus üleujutatud alal, kuid mullaniiskusega olulist seost ei tuvastatud.

Lämmastikku fikseerivate mikroobide arvukust mõjutas üleujutatud ala erinevatel perioodidel orgaanilise aine, P, Ca, Mg, pH ja üldlämmastiku sisaldus. Samas olulised seosed füüsilis-keemiliste parameetritega puudusid kontrollalal. Järelikult aitas üleujutus lämmastiku fikseerijatel paremini omastada erinevaid toitaineid. Troopilise turbaala uuringus on näidatud, et lämmastikku fikseerivate mikroobide mitmekesisust mõjutab peamiselt mulla nitraadi kontsentratsioon, kuid oluliseks keskkonna teguriks on ka temperatuur (Espenberg *et al.*, 2018).

Uurimisalal domineerisid ammooniumi oksüdeeruvatest mikroorganismidest arhed. AOA domineerib keskkondades, kus on madalad  $\text{NH}_3$  kontsentratsioonid, orgaanilise aine või hapniku kontsentratsioonid (Guo *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 2018). Lisaks on He ja teised (2007) näidanud oma uuringutulemustes, et AOB ja AOA arvukuse suuruse ning pH vahel esineb positiivne korrelatsioon. Töö tulemustest oli näha, et pH ja orgaanilise aine kontsentratsioon oli madalam üleujutatud alal, kuid arhede *amoA* arvukus oli suurem kontrollalal. Järelikult võib eeldada, et AOA-d mõjutas enamasti mulla hapniku sisaldus. AOB on üleujutustele vastupidavamad kui AOA-d, sest bakterite *amoA* arvukus ei erinenud oluliselt nii katsealade vahel kui ka erinevatel ajaperioodidel. Üleujutatud alal leiti, et AOA arvukus suurenes



statistiliselt oluliselt pärast üleujutuskatset. Kontrollalal AOA arvukuste vahel samas statistilisi olulisi erinevusi ei leitud. Seega võib järeldada, et üleujutus mõjutas AOA arvukust. Samas on üleujutuskatsetega leitud, et AOA ja AOB kooslused on suhteliselt vastupidavad ning nende arvukus ei muutu oluliselt üleujutusperioodil (Nguyen *et al.*, 2018).

Nitrifikatsiooni protsessi käigus akumuleerub mulda  $\text{NO}_3^-$  ja protsessi aeglustumise tulemusena võib  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsioon olla oluliselt madalam pärast üleujutust (Nguyen *et al.*, 2018). Uuringutega on leitud, et mulla  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsioon on oluline tegur nitrifitseerivate mikroorganismide arvukuste identifitseerimisel ning tugevaim seos esineb tavaliselt COMAMMOX *amoA* arvukusega (Osburn & Barrett, 2020). Üleujutatud alal täheldati mulla  $\text{NO}_3^-$  ja COMAMMOX *amoA* vahel olulist positiivset seost ning mulla  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooni olulist langemist eksperimendi ajal, mis võib seega viidata nitrifikatsiooniprotsessi aeglustumisele. Lisaks langes  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsioon oluliselt ka kontrollalal pärast üleujutuskatset, mille arvatavasti põhjustas sademete tulemusena suurenenud mullaniiskus. COMAMMOX ja arhede *amoA* geeni arvukus oli negatiivselt seotud ka  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsiooniga üleujutatud alal pärast üleujutust. Nitrifikatsioon kasutab protsessi toimimiseks mulla  $\text{NH}_4^+$  varusid (Koch *et al.*, 2019) ja kuna mulla  $\text{NH}_4^+$  kontsentratsioon üleujutuse järel tõusis oluliselt, võib eeldada, et üleujutuse järgsel perioodil langes nitrifikatsiooniprotsess veelgi.

Denitrifikatsiooni markergeenide (*nirK*, *nirS*, *nosZI* ja *nosZII*) mitmekesisust mõjutab enamasti mulla süsiniku ja lämmastiku kontsentratsioon ning hüdroloogiline manipulatsioon (Espenberg *et al.*, 2018; Abbas *et al.*, 2019). Denitrifikatsiooni markergeenidest oli suurima arvukusega *nirK* ning lisaks oli *nir* markergeenide arvukus suurem kui *nos* markergeenide arvukus. Viimasest võib seega eeldada, et denitrifikatsiooniprotsess ei pruukinud alati lõpuni minna. Lisaks on *nirS* geeni omavad organismid suurema tõenäosusega täielikud denitrifitseerijad, sest nad omavad enamasti ka *nosZ* geene (Graf *et al.*, 2014). Seega ökosüsteemid, kus domineerivad *nirK* geenidega mikroorganismid on suurema tõenäosusega  $\text{N}_2\text{O}$  emiteerijad (Graf *et al.*, 2014).

Üleujutuse järel on näidatud *nosZ* geenide arvukuse suurenemist mullas (Nguyen *et al.*, 2018). Uurimistöös selgus, et üleujutusel oli oluline mõju *nosZII* arvukuse suurenemisele üleujutusperioodil. Lisaks oli *nosZII* arvukus suurem kui *nosZI* arvukus katsealade lõikes. Uuringutega on leitud, et *nosZI* geene omavad organismid on suurema tõenäosusega täielikud denitrifitseerijad, sest esinevad tavaliselt koos *nirK* või *nirS* markergeenidega mikroobides (Graf *et al.*, 2014). Lisaks oli tulemustest näha, et *nosZI* ja *nosZII* markergeenide arvukust

mõjutasid erinevad füüsilis-keemilise parameetrid. See näitab, et neil on erinevad ökoloogilised nišid. Näiteks on troopilise turbaala uuringus leitud, et looduslikus turbaala mullas kontrollib N<sub>2</sub>O reduktsiooni N<sub>2</sub>-ks enamasti *nosZI* geeniga organismid, kuid kuivendatud aladel on redutseerijateks peamiselt *nosZII* geeniga mikroorganismid (Espenberg *et al.*, 2018).

N<sub>2</sub>O emissioon mullast tuleneb enamasti nitrifikatsiooni või denitrifikatsiooni protsessist ning N<sub>2</sub>O emissioonid sõltuvad nitraadi ja orgaanilise aine kontsentratsioonist ning niikusest mullas (Pärn *et al.*, 2018). Lisaks on näidatud, et pidevalt üleujutatud aladelt emiteerub N<sub>2</sub>O vähe, kuid alade kuivendamise kaasaegne mullaniiskuse kõikumisega N<sub>2</sub>O emissioonid suurenevad (Pärn *et al.*, 2018). Ka Mander ja teised (2015) leidsid, et lühiajalise üleujutusega vähenes mulla N<sub>2</sub>O emissioon ning põhjavee alanemisega täheldati mulla N<sub>2</sub>O emissiooni suurenemist. Bakalaurusetöö uuringus leiti üleujutuse ajal samuti negatiivne seos denitrifikatsiooni ja nitrifikatsiooni markergeenide ning mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel. Pärast üleujutust oli üleujutatud alal aga oluline positiivne seos COMAMMOX ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel ning kontrollalal mulla N<sub>2</sub>O emissiooni ning *nirK* ja *nosZI* vahel. Oluline seos kontrollalal ja denitrifikatsiooni markergeenide vahel esines arvatavasti sellepärast, et kontrollalal suurenes üleujutuse järgsel perioodil keskmine mullaniiskuse 0,4-lt 0,6 m<sup>3</sup> m<sup>-3</sup>, mis muutis keskkonna denitrifitseerivatele organismidele sobivamaks. Lisaks on leitud, et kõrgemad NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioonid inhibeerivad *nosZ* markergeenide aktiivsust (Hallin *et al.*, 2018) ja seega võib selle kõrgemate kontsentratsioonide juures olla denitrifikatsiooniprotsess mittetäielik.

Üleujutatud alal korreleerus mulla N<sub>2</sub>O emissiooniga positiivselt ka *nrfA* geenikoopiate arvukus üleujutuse ajal. Kõige olulisemateks teguriteks, mis mõjutavad DNRA protsessi, on C/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> suhe, mulla hapniku ja orgaanilise aine sisaldus (Rütting *et al.*, 2011). DNRA on aktiivsem niiskemates piirkondades (Rütting *et al.*, 2011). Uurimistööga sarnane positiivne seos *nrfA* ja mulla N<sub>2</sub>O emissiooni vahel leiti ka Espenberg ja teiste (2018) uuringus. Töö tulemustest oli näha, et üleujutuse ajal oli siiski N<sub>2</sub>O voog üleujutatud alal veidi kõrgem ning selle võis põhjustada *nrfA* geene omavate organismide aktiivsus või *nirK* geenide suurem arvukus üleujutuse ajal.

Lisaks füüsilis-keemilistele parameetritele on leitud, et markergeenide arvukust võib mõjutada ka üleujutuse kestus. Wang ja teised (2016) leidsid, et n-damo markergeene leidub kõikuva veetasemega piirkondades ning pikema üleujutusega alad on seda geeni omavatele organismidele sobivamad. Seda täheldati ka bakalaurusetöö uurimuses, kus leiti, et üleujutusel

oli positiivne mõju n-damo protsessi läbi viivate organismide arvukusele. Lisaks täheldati n-damo markergeenide arvukuse suurenemist kontrollalal pärast üleujutuskatset, mis oli ilmselt seotud ka toimunud tugevate vihmavalingutega.

Muld ja puutüved olid üleujutuse ajal  $N_2O$  emissiooni allikad (Schindler *et al.*, 2020). Kontrollala ja üleujutatud ala puutüvede  $N_2O$  emissioonid erinesid statistiliselt oluliselt vaid pärast üleujutust maapinna lähedalt mõõdetud puutüvedest, kusjuures puutüve  $N_2O$  emissioon oli kõrgem kontrollalal (Schindler *et al.*, 2020). Seda võib seletada *nirK* ja *nosZI* oluline positiivne seos maapinnalähedalt mõõdetud puutüve  $N_2O$  emissiooniga. Lisaks leiti markergeenide arvukuste ja  $N_2O$  emissioonide vahel rohkem olulisi seoseid puutüvedest madalamalt mõõdetud emissioonidega. Schindler ja teised (2020) leidsid samuti, et puutüvede  $N_2O$  emissioonid kahanevad kõrgusega. Tulemustest ei selgunud selget üleujutuste mõju puutüvede  $N_2O$  emissioonidele üleujutuse ajal, kuid võib eeldada, et puutüvede emissioone mõjutavad hoopis järsud mullaniiskuse muutused nagu näiteks sademed.

Uurimistöö tulemused annavad olulist teavet kaldaäärsete lepikute muldades toimuvatele lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsessidele ja kuidas muutuvad keskkonnatingimused mõjutavad seal asuvaid mikroobikooslusi ja neist tulenevaid  $N_2O$  emissioone. Tulemustest võib järeldada, et mullaniiskus mõjutab mikroorganismide arvukust. Lühiajalise üleujutuse korraldamisel ilmnes ka sademete oluline mõju.

## Kokkuvõte

Kliimamuutused on põhjustanud ekstreemsete kliimasündmuste sagenemise. Selle tõttu on suurenenud ka üleujutuste ja intensiivsete sademete sagenemine parasvöötmepiirkondades. Üleujutustel on oluline mõju mullas toimuvatele biogeokeemilistele aineringetele, mille tagajärjeks võib olla ka ohtlike kasvuhoonegaaside emissioonide suurenemine.

Uurimistöö eesmärgiks oli hinnata lühiajalise üleujutuse mõju lämmastikuringe mikrobioloogiliste protsesside potentsiaalidele kaldaäärse lepiku mullas. Mullaproovid koguti Agali proovialalt 2017. aasta juulist kuni novembrini ja 2018. aasta augustis. Lämmastikuringe protsesse hinnati markergeenide abil, mille arvukusi kvantifitseeriti qPCR meetodiga. Markergeenide arvukuste muutusi võrreldi füüsikalise-keemiliste parameetrite ja N<sub>2</sub>O emissioonidega. Üleujutuse mõju tuvastamiseks võrreldi kontrollala ja üleujutatud ala geenikoopiate arvukusi t-testiga ning konkreetse ala arvukuste muutusi ühefaktorilise dispersioonianalüüsiga (*one-way* ANOVA). Füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geenikoopiate arvukuste oluliste seoste leidmiseks ja hindamiseks kasutati Spearman'i korrelatsioonikoefitsienti.

Mikroorganismide arvukusi mõjutasid oluliselt lisaks lühiajalisele üleujutusele ka sademed, sest markergeenide arvukuste muutused olid mõlemal katsealal mitmetel juhtudel sarnased. Lühiajaline üleujutus mõjutas oluliselt bakterite, arhede *amoA*, n-damo spetsiifilise 16S rRNA ning *nosZII* geene omavate mikroorganismide arvukust. Lisaks leiti, et üleujutus mõjutas *nifH* geeni omavate mikroorganismide toitainete omastamist. Olulist üleujutuse mõju ei täheldatud arhede ning bakterite *amoA* ja *nirK* geenidega mikroobidele. COMAMMOX *amoA*, *nirS*, *nosZI* ja *nrfA* geene omavate mikroorganismide arvukus muutus oluliselt eksperimendi erinevatel perioodidel. Samas kontrollala ja üleujutatud ala ei erinenud üksteisest statistiliselt oluliselt ja seega selget üleujutuse mõju nende geenide puhul ei tuvastatud, kuid oli näha, et geenidele avaldasid olulist mõju sademed. Kõrgema mullaniiskusega katselappidel leiti rohkem olulisi seoseid keemiliste parameetritega. Enamasti mõjutas markergeenide arvukust mulla pH, Ca ja Mg kontsentratsioon. Olulisi seoseid tuvastati ka mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ja NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kontsentratsiooniga, mis mõjutasid kõige enam nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni läbi viivate geenikoopiate arvukust.

Üleujutuse ajal ei muutunud N<sub>2</sub>O emissioonid mullast statistiliselt oluliselt. Samas täheldati üleujutatud alal keskmise mulla N<sub>2</sub>O emissiooni langust üleujutuse ajal. Lisaks leiti, et nitrifikatsiooni protsess aeglustus üleujutuse ajal, sest mulla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> kontsentratsioon langes.

Peale üleujutust täheldati aga mulla N<sub>2</sub>O emissiooni tõusu nii üleujutatud kui ka kontrollalal. Mulla N<sub>2</sub>O emissioonid suurenesid pärast kuivema ala järsku niisutamist ning suurimad N<sub>2</sub>O emissioonid ilmnevad, kui mullaniiskus on 0,5–0,6 m<sup>-3</sup> m<sup>3</sup>.

Puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonidest tuvastati üleujutuse mõju vaid maapinnalähedalt mõõdetud N<sub>2</sub>O voole, mil leiti, et üleujutuse järgsel perioodil on puutüve N<sub>2</sub>O emissioon oluliselt madalam üleujutatud alal kui kontrollalal. Puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide seostamisel markergeenide arvukuste muutustega täheldati üleujutatud alal enamasti negatiivseid seoseid. Uurimistöö käigus ei selgunud selget üleujutuste mõju N<sub>2</sub>O emissioonidele. Olulisi seoseid leiti rohkem maapinnalähedalt mõõdetud N<sub>2</sub>O emissiooniga, kust mõõdeti ka suuremad emissioonid kui kõrgemalt puutüvedest.

Tulemustest saab järeldada, et mulla ja puutüvede N<sub>2</sub>O vooge mõjutasid üleujutatud alal või kontrollalal nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni läbiviivate markergeenide arvukuste muutused. Mulla N<sub>2</sub>O emissioon suurenes pärast üleujutust või pärast sademeid, kui mullaniiskus järsult muutus, ning puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonid on enamasti suuremad üleujutuse ajal. Tulevikus oleks oluline koguda mullaproove tihedamalt, et leida, kuidas täpsemalt järsud mullaniiskuse muutused mõjutavad markergeenide arvukusi ja N<sub>2</sub>O emissioone, ning rohkem tähelepanu tuleb pöörata ka intensiivsete sademete mõjule.

## Microbial nitrogen cycle response to short-term flooding in a riparian forest soil

Kristel Reiss

### Summary

Global climate changes have been accompanied by an increase in the frequency and intensity of precipitation in temperate regions, which has increased the risk of flooding. Studies have shown that floods alter the soil's hydrological composition and the microorganisms, which in turn influence the biogeochemical cycle and greenhouse gas fluxes. In addition, the increased risk of flooding can impact riparian forests, which are often seen as buffer zones that help improve surface and groundwater quality by removing excess nitrogen and pollution. Grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) is a widely spread tree species in riparian forests, which also has a significant effect on soil chemical properties. Thus, understanding the intricacies of the forest nitrogen cycle or adaptation to climate change will help predict possible changes in forest ecosystems.

The aim of the bachelor's thesis was to study the impact of short-term flooding on the presence and density of soil bacteria and archaea and their potential to perform nitrogen transformation processes. Furthermore, it was examined how the change in the microorganisms is related to the physico-chemical changes and nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions in riparian alder forest. An inundation experiment was carried out in the riparian alder forest, where the sample area was divided into two: the control plot and the flooded plot. Soil samples were collected from the sample plots in the summer and autumn of 2017 and in August 2018. Marker genes were used to study the potential of microbiological processes in the nitrogen cycle. Marker genes abundances were quantified qPCR method. The following nitrogen cycle processes were studied: nitrogen fixation (*nifH*), nitrification (bacterial and archaeal *amoA*), complete ammonium oxidation (COMAMMOX *amoA*), dissimilatory nitrate reduction to ammonium (*nrfA*), denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZI*, *nosZII*) and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane (n-damo-specific 16S rRNA gene). One-way analysis of variance (one-way ANOVA) and t-test were used to assess variances in physicochemical and genetic parameters, and the Spearman correlation coefficient was used to determine significant relationships.

Results showed similar changes in both plots, and it is likely that precipitation, rather than short-term flooding, had a greater impact on the microorganisms. Flooding impacted the abundance of bacteria and microorganisms that have archaeal *amoA* n-damo, and *nosZII*

genes. In addition, flooding was found to affect the nutrient uptake of microorganisms carrying the *nifH* genes. In contrast to the results on soil moisture, more significant impact was identified in the chemical parameters. The greatest impact on the abundance of marker genes was shown by soil pH, Ca and Mg concentration, but significant correlations were also found with soil  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  concentrations.

$\text{N}_2\text{O}$  emissions are usually a by-product of either the nitrification or denitrification process. The results evidenced that the soil  $\text{N}_2\text{O}$  flux did not change significantly with the flooding experiment. Similarly, a trend was seen where soil  $\text{N}_2\text{O}$  emissions were lower before and during the flooding, and emissions increased in both plots after the flooding experiment. After the flood, a significant positive relationship was observed between soil  $\text{N}_2\text{O}$  emission and COMAMMOX *amoA* in the flooded plot and between *nirK*, *nosZI* and soil emission  $\text{N}_2\text{O}$  in the control plot.

The flooding experiment had a significant effect on the stem  $\text{N}_2\text{O}$  emissions measured close to the ground after the experiment, with lower emissions occurring in the flooded plot. This may be due to the negative association between *nirK*, *nirS* and *nosZII* and the tree stem  $\text{N}_2\text{O}$  flux in the flooded area. The control area, on the other hand, showed a positive association with *nirK* and *nosZI* after flooding. During the flood, there were mostly negative correlations between marker genes and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions, and thus no specific flooding impact to the  $\text{N}_2\text{O}$  emissions from stems was found.

It can be concluded that marker genes abundances were influenced, above all, by sudden changes in soil moisture and other chemical parameters. In the future, it would be important to collect soil samples more frequently to determine how abrupt changes in soil moisture impacts the marker genes and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions. In addition, more attention needs to be paid to the effects of heavy rainfall.

## Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajaid Mikk Espenbergi ja Ülo Mandrit, kes aitasid mind teema valikuga ja pühendasid aega minu töö juhendamiseks. Samuti soovin tänada ka teisi „*Short-term flooding increases CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum*“ (2020) artikli autoreid, kelle kogutuid andmeid kasutasin bakalaureusetöös. Lisaks tänan Kärt Kangerit, kes abistas mullaproovide kogumise ja laboritöödega.



## Kasutatud kirjandus

- Abbas, T., Zhang, Q., Jin, H., Li, Y., Liang, Y., Di, H., & Zhao, Y. (2019). Anammox microbial community and activity changes in response to water and dissolved oxygen managements in a paddy-wheat soil of Southern China. *Science of The Total Environment*, 672, 305–313.
- Alfieri, L., Burek, P., Feyen, L., & Forzieri, G. (2015). Global warming increases the frequency of river floods in Europe. *Hydrology and Earth System Sciences*, 19(5), 2247.
- Allen, M., Antwi-Agyei, P., Aragon-Durand, F., Babiker, M., Bertoldi, P., Bind, M., Brown, S., Buckeridge, M., Camilloni, I., Cartwright, A., & others. (2019). *Technical Summary: Global warming of 1.5° C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5° C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.*
- Bonan, G. B. (2008). Forests and climate change: Forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *science*, 320(5882), 1444–1449.
- Cameron, K., Di, H. J., & Moir, J. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: A review. *Annals of applied biology*, 162(2), 145–173.
- Caudullo, G., Welk, E., & San-Miguel-Ayanz, J. (2017). Chorological maps for the main European woody species. *Data in brief*, 12, 662–666.
- Christiansen, J., & Gundersen, P. (2011). Stand age and tree species affect N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> exchange from afforested soils. *Biogeosciences*, 8(9), 2535–2546.
- Clerici, N., Weissteiner, C. J., Paracchini, M. L., Boschetti, L., Baraldi, A., & Strobl, P. (2013). Pan-European distribution modelling of stream riparian zones based on multi-source Earth Observation data. *Ecological indicators*, 24, 211–223.
- Correll, D. (1996). Buffer zones and water quality protection: General principles. *Buffer zones: Their processes and potential in water protection*, 7–20.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., Bergen, von M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, Per H., & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.

- Espenberg, M., Truu, M., Mander, Ü., Kasak, K., Nölvak, H., Ligi, T., Oopkaup, K., Maddison, M., & Truu, J. (2018). Differences in microbial community structure and nitrogen cycling in natural and drained tropical peatland soils. *Scientific reports*, 8(1), 1–12.
- Ettwig, K. F., Van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K. T., Jetten, M. S., & Strous, M. (2009). Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3656–3662.
- Ewing, K. (1996). Tolerance of four wetland plant species to flooding and sediment deposition. *Environmental and Experimental Botany*, 36(2), 131–146.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889–892.
- Garssen, A. G., Baattrup-Pedersen, A., Voesenek, L. A., Verhoeven, J. T., & Soons, M. B. (2015). Riparian plant community responses to increased flooding: A meta-analysis. *Global Change Biology*, 21(8), 2881–2890.
- Gonzalez, J. M. P., Manero, F. J. G., Probanza, A., Acero, N., & Castro, F. B. de. (1995). Effect of alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.) roots on distribution of proteolytic, ammonifying, and nitrifying bacteria in soil. *Geomicrobiology Journal*, 13(2), 129–138. <https://doi.org/10.1080/01490459509378011>
- Graf, D. R., Jones, C. M., & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N<sub>2</sub>O emissions. *PloS one*, 9(12), e114118.
- Guilyardi, E., Lescarmonier, L., Matthews, R., Point, S. P., Rumjaun, A. B., Schlüpmann, J., & Wilgenbus, D. (2018). *IPCC Special Report “Global Warming of 1.5° C”: Summary for teachers*.
- Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Ma, B., Ge, S., Wang, Z., Huang, H., Zhang, J., & Zhang, L. (2013). Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission. *Critical reviews in environmental science and technology*, 43(21), 2213–2296.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F. E., Sanford, R. A., & Jones, C. M. (2018). Genomics and ecology of novel N<sub>2</sub>O-reducing microorganisms. *Trends in Microbiology*, 26(1), 43–55.
- He, J., Shen, J., Zhang, L., Zhu, Y., Zheng, Y., Xu, M., & Di, H. (2007). Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing

archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental microbiology*, 9(9), 2364–2374.

Head, I., Saunders, J., & Pickup, R. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*, 35(1), 1–21.

Hefting, M., Clement, J.-C., Dowrick, D., Cosandey, A.-C., Bernal, S., Cimpian, C., Tatur, A., Burt, T., & Pinay, G. (2004). Water table elevation controls on soil nitrogen cycling in riparian wetlands along a European climatic gradient. *Biogeochemistry*, 67(1), 113–134.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986–994.

Hernandez, M. E., & Mitsch, W. J. (2006). Influence of hydrologic pulses, flooding frequency, and vegetation on nitrous oxide emissions from created riparian marshes. *Wetlands*, 26(3), 862–877.

Hutchins, D. A., Jansson, J. K., Remais, J. V., Rich, V. I., Singh, B. K., & Trivedi, P. (2019). Climate change microbiology—Problems and perspectives. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 391–396.

Johansson, T. (1999). Site index curves for common alder and grey alder growing on different types of forest soil in Sweden. *Scandinavian journal of forest research*, 14(5), 441–453.

Jones, C. M., Stres, B., Rosenquist, M., & Hallin, S. (2008). Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecular biology and evolution*, 25(9), 1955–1966.

Kachenchart, B., Jones, D. L., Gajasen, N., Edwards-Jones, G., & Limsakul, A. (2012). Seasonal nitrous oxide emissions from different land uses and their controlling factors in a tropical riparian ecosystem. *Agriculture, ecosystems & environment*, 158, 15–30.

Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C., & Mermoud, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC bioinformatics*, 8(1), 131.

Karthikeyan, A., Deeparaj, B., & Nepolean, P. (2009). Reforestation in bauxite mine spoils with *Casuarina equisetifolia* frost. And beneficial microbes. *Forests, Trees and Livelihoods*, 19(2), 153–165.

Keskkonnaministeeriumi kodulehekül. (2020). Metsastatistika. Vaadatud 21.05.21 <https://www.envir.ee/et/metsastatistika>

- Koch, H., van Kessel, M. A., & Lücker, S. (2019). Complete nitrification: Insights into the ecophysiology of comammox Nitrospira. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(1), 177–189.
- Kozłowski, T. (1997). Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree physiology*, 17(7), 490–490.
- Kozłowski, T. T. (2002). Physiological-ecological impacts of flooding on riparian forest ecosystems. *Wetlands*, 22(3), 550–561.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., & others. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2–3), 95–125.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263.
- LeBauer, D. S., & Treseder, K. K. (2008). Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology*, 89(2), 371–379.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S., & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806–809.
- Levin, S. A. (1998). Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. *Ecosystems*, 1(5), 431–436.
- Luke, S. H., Luckai, N. J., Burke, J. M., & Prepas, E. E. (2007). Riparian areas in the Canadian boreal forest and linkages with water quality in streams. *Environmental Reviews*, 15(NA), 79–97.
- Lõhmus, K., Mander, Ü., Tullus, H., & Keedus, K. (1996). Productivity, buffering capacity and resources of grey alder forests in Estonia. *Short rotation willow coppice for renewable energy and improved environment. Uppsala*, 95–105.
- Maa-ameti kodulehekül. (i.aa). Maainfo. Vaadatud 21.05.2021  
<https://xgis.maaamet.ee/xgis2/page/app/maainfo>
- Maa-ameti kodulehekül. (i.ab). Mullakaart. Vaadatud 21.05.2021  
[https://xgis.maaamet.ee/maps/XGis?app\\_id=MA29&user\\_id=at&LANG=1&WIDTH=1380&HEIGHT=949&zlevel=0,552500,6505000](https://xgis.maaamet.ee/maps/XGis?app_id=MA29&user_id=at&LANG=1&WIDTH=1380&HEIGHT=949&zlevel=0,552500,6505000)

- Maamets, L. (2004). Hall lepp—Kas eesti metsade tuhkatüütu? *Eesti Loodus*, märts. Vaadatud 21.05.2021 [http://eestiloodus.horisont.ee/artikkel638\\_632.html](http://eestiloodus.horisont.ee/artikkel638_632.html)
- Machacova, K., Vainio, E., Urban, O., & Pihlatie, M. (2019). Seasonal dynamics of stem N<sub>2</sub>O exchange follow the physiological activity of boreal trees. *Nature communications*, 10(1), 1–13.
- Mander, Ü., Kuusemets, V., & Ivask, M. (1995). Nutrient dynamics of riparian ecotones: A case study from the Porijõgi River catchment, Estonia. *Landscape and urban planning*, 31(1–3), 333–348.
- Mander, Ü., Lohmus, K., Teiter, S., Uri, V., & Augustin, J. (2008). Gaseous nitrogen and carbon fluxes in riparian alder stands. *Boreal Environment Research*, 13, 231–241.
- Mander, Ü., Maddison, M., Soosaar, K., & Karabelnik, K. (2011). The impact of pulsing hydrology and fluctuating water table on greenhouse gas emissions from constructed wetlands. *Wetlands*, 31(6), 1023–1032.
- Mander, Ü., Maddison, M., Soosaar, K., Teemusk, A., Kanal, A., Uri, V., & Truu, J. (2015). The impact of a pulsing groundwater table on greenhouse gas emissions in riparian grey alder stands. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(4), 2360–2371.
- Mania, D., Heylen, K., van Spanning, R. J., & Frostegård, Å. (2014). The nitrate-ammonifying and nosZ-carrying bacterium *Bacillus vireti* is a potent source and sink for nitric and nitrous oxide under high nitrate conditions. *Environmental microbiology*, 16(10), 3196–3210.
- Mommer, L., & Visser, E. J. (2005). Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: A matter of leaf plasticity. *Annals of botany*, 96(4), 581–589.
- Moon, J. B., Wardrop, D. H., Fennessy, M. S., Ingram, H. M., Britson, A., & Okoro, M. H. (2020). Variation in surface and subsurface nitrogen cycling in headwater floodplain wetlands due to soil type and wetland condition. *Wetlands Ecology and Management*, 1–25.
- Naiman, R. J., Bunn, S. E., Nilsson, C., Petts, G. E., Pinay, G., & Thompson, L. C. (2002). Legitimizing fluvial ecosystems as users of water: An overview. *Environmental management*, 30(4), 455–467.
- Naiman, R. J., & Decamps, H. (1997). The ecology of interfaces: Riparian zones. *Annual review of Ecology and Systematics*, 28(1), 621–658.

- Naiman, R. J., Fetherston, K. L., McKay, S. J., & Chen, J. (1998). Riparian forests. *River ecology and management: lessons from the Pacific Coastal Ecoregion*, 289–323.
- Nguyen, L. T., Osanai, Y., Anderson, I. C., Bange, M. P., Tissue, D. T., & Singh, B. K. (2018). Flooding and prolonged drought have differential legacy impacts on soil nitrogen cycling, microbial communities and plant productivity. *Plant and Soil*, 431(1–2), 371–387.
- Osburn, E. D., & Barrett, J. (2020). Abundance and functional importance of complete ammonia-oxidizing bacteria (comammox) versus canonical nitrifiers in temperate forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 145, 107801.
- Petersen, C. R., Jovanovic, N., & Grenfell, M. (2020a). The effectiveness of riparian zones in mitigating water quality impacts in an agriculturally dominated river system in South Africa. *African Journal of Aquatic Science*, 45(3), 336–349.
- Philippot, L., Hallin, S., & Schloter, M. (2007). Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in agronomy*, 96, 249–305.
- Pinay, G., Ruffinoni, C., & Fabre, A. (1995). Nitrogen cycling in two riparian forest soils under different geomorphic conditions. *Biogeochemistry*, 30(1), 9–29.
- Poff, N. L. (2002). Ecological response to and management of increased flooding caused by climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 360(1796), 1497–1510.
- Prăvălie, R. (2018). Major perturbations in the Earth's forest ecosystems. Possible implications for global warming. *Earth-Science Reviews*, 185, 544–571.
- Preem, J.-K., Truu, J., Truu, M., Mander, Ü., Oopkaup, K., Lõhmus, K., Helmisaari, H.-S., Uri, V., & Zobel, M. (2012). Bacterial community structure and its relationship to soil physico-chemical characteristics in alder stands with different management histories. *Ecological Engineering*, 49, 10–17.
- Pärn, J., Verhoeven, J. T., Butterbach-Bahl, K., Dise, N. B., Ullah, S., Aasa, A., Egorov, S., Espenberg, M., Järveoja, J., Jauhiainen, J., & others. (2018). Nitrogen-rich organic soils under warm well-drained conditions are global nitrous oxide emission hotspots. *Nature communications*, 9(1), 1–8.
- Roy, S., Khasa, D. P., & Greer, C. W. (2007). Combining alders, frankiae, and mycorrhizae for the revegetation and remediation of contaminated ecosystems. *Botany*, 85(3), 237–251.

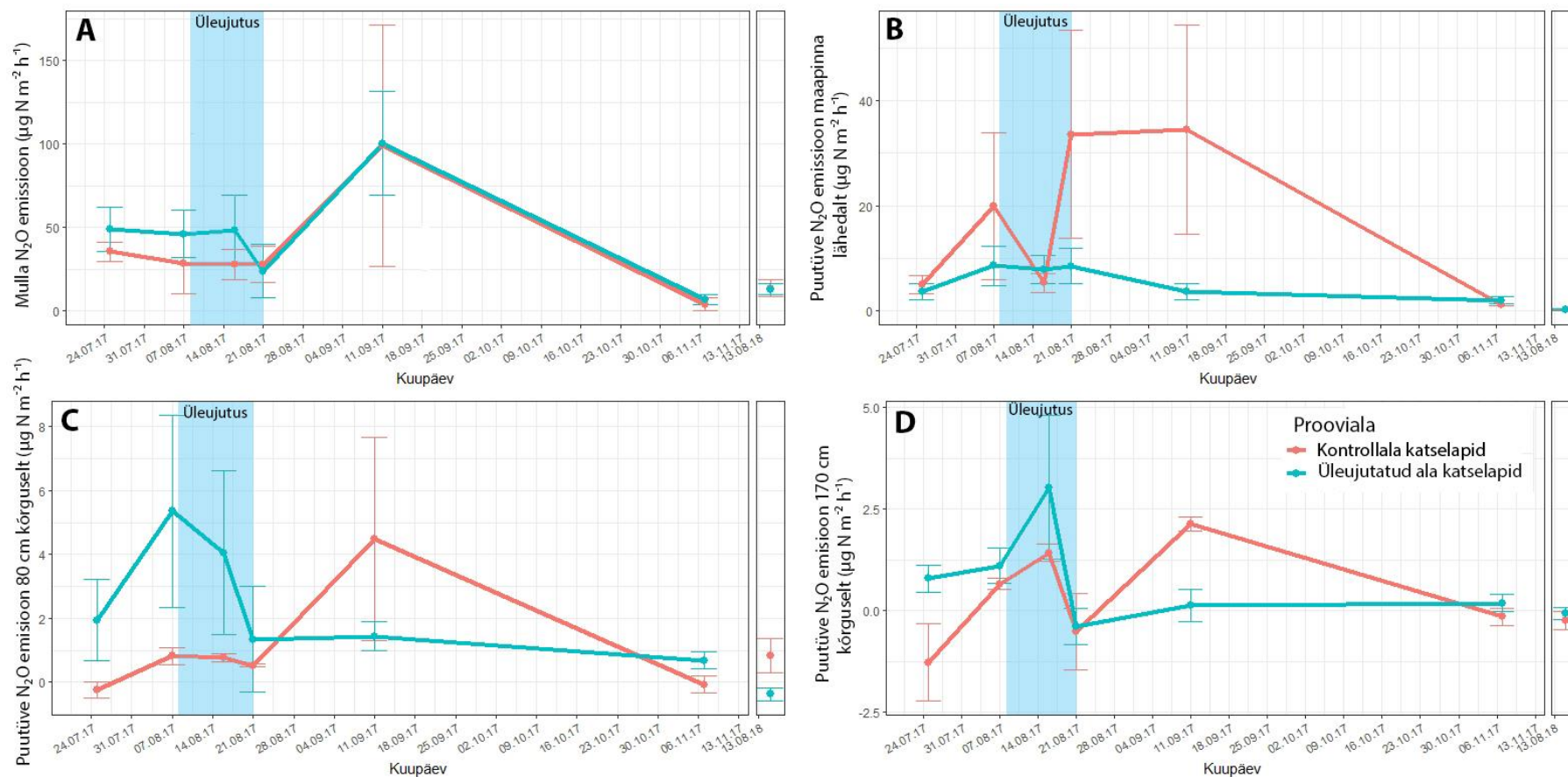
- Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., & Klemetsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8(7), 1779–1791.
- Schindler, T., Mander, Ü., Machacova, K., Espenberg, M., Krasnov, D., Escuer-Gatius, J., Veber, G., Pärn, J., & Soosaar, K. (2020). Short-term flooding increases CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O emissions from trees in a riparian forest soil-stem continuum. *Scientific reports*, 10(1), 1–10.
- Sharma, S., Radl, V., Hai, B., Kloos, K., Fuka, M. M., Engel, M., Schauss, K., & Schlöter, M. (2007). Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 68(3), 445–452.
- Shukla, P., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., Van Diemen, R., & others. (2019). *IPCC, 2019: Climate Change and Land: An IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems*.
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 6–20.
- Soosaar, K., Mander, Ü., Maddison, M., Kanal, A., Kull, A., Lõhmus, K., Truu, J., & Augustin, J. (2011). Dynamics of gaseous nitrogen and carbon fluxes in riparian alder forests. *Ecological Engineering*, 37(1), 40–53.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., & Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environmental microbiology*, 5(7), 539–554.
- Thamdrup, B. (2012). New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 407–428.
- Truu, M., Nõlvak, H., Ostonen, I., Oopkaup, K., Maddison, M., Ligi, T., Espenberg, M., Uri, V., Mander, Ü., & Truu, J. (2020). Soil Bacterial and Archaeal Communities and Their Potential to Perform N-Cycling Processes in Soils of Boreal Forests Growing on Well-Drained Peat. *Frontiers in microbiology*, 11, 3112.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619–626.

- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., & Tilman, D. G. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737–750.
- Wang, Y., Huang, P., Ye, F., Jiang, Y., Song, L., den Camp, H. J. O., Zhu, G., & Wu, S. (2016). Nitrite-dependent anaerobic methane oxidizing bacteria along the water level fluctuation zone of the Three Gorges Reservoir. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(4), 1977–1986.
- Waring, R. H., & Schlesinger, W. (1985). Forest ecosystems. *Analysis at multiples scales*, 55.
- Welsh, A., Chee-Sanford, J. C., Connor, L. M., Löffler, F. E., & Sanford, R. A. (2014). Refined NrfA phylogeny improves PCR-based nrfA gene detection. *Applied and environmental microbiology*, 80(7), 2110–2119.
- Wright, A. J., de Kroon, H., Visser, E. J., Buchmann, T., Ebeling, A., Eisenhauer, N., Fischer, C., Hildebrandt, A., Ravenek, J., Roscher, C., & others. (2017). Plants are less negatively affected by flooding when growing in species-rich plant communities. *New Phytologist*, 213(2), 645–656.
- Wright, A. J., Ebeling, A., De Kroon, H., Roscher, C., Weigelt, A., Buchmann, N., Buchmann, T., Fischer, C., Hacker, N., Hildebrandt, A., & others. (2015). Flooding disturbances increase resource availability and productivity but reduce stability in diverse plant communities. *Nature communications*, 6(1), 1–6.
- Yin, Z., Bi, X., & Xu, C. (2018). Ammonia-oxidizing archaea (AOA) play with ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in nitrogen removal from wastewater. *Archaea*, 2018.



## Lisad 1-5

**Lisa 1.** Mulla (A) ja puutüvede N<sub>2</sub>O emissioonide (maapinna lähedalt (B), 80 cm kõrguselt (C) ja 170 cm kõrguselt (D) mõõdetud N<sub>2</sub>O emissioonid) muutused uurimisperiodil. Sinise joonega on tähistatud üleujutatud ala ja punase joonega kontrollala puutüvede N<sub>2</sub>O emisioonide muutused. Helesinine värvitud ala joonisel tähistab üleujutuse perioodi.



**Lisa 2.** Statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ) seosed geenikoopiate arvukuste ja puutüvede ning mulla N<sub>2</sub>O emissioonide vahel. Tabelis on sulgudes esitatud Spearmani korrelatsioonikoefitsient R.

Tunnus	Üleujutatud ala			Kontrollala	
	PRE	EXP	POST	EXP	POST
Puutüve N <sub>2</sub> O maapinna lähedalt	arh 16S (-0,53)	arh 16S (-0,55), bakt 16S (-0,76), arh <i>amoA</i> (-0,64), COMAMMOX (-0,66), <i>nifH</i> (-0,60), <i>nirK</i> (-0,57), <i>nirS</i> (-0,74), <i>nosZI</i> (-0,67), <i>nosZII</i> (-0,66)	arh 16S (-0,65), bakt 16S (-0,79), bakt <i>amoA</i> (-0,69), <i>nirK</i> (-0,57), <i>nirS</i> (-0,68), <i>nosZII</i> (-0,81)	arh 16S (-0,89), bakt 16S (-0,83), <i>nosZII</i> (-0,94)	n-damo (0,94), <i>nirK</i> (0,81), <i>nosZI</i> (0,83)
Puutüve N <sub>2</sub> O 80 cm		arh <i>amoA</i> (-0,65), COMAMMOX (-0,83), <i>nirK</i> (-0,73), <i>nirS</i> (-0,73), <i>nosZI</i> (-0,78)	n-damo (0,64), <i>nifH</i> (-0,83)		
Puutüve N <sub>2</sub> O 170 cm	<i>nirS</i> (-0,65)	bakt 16S (-0,76), COMAMMOX (-0,81), n-damo (0,72), <i>nirK</i> (-0,75), <i>nosZI</i> (-0,71), <i>nrfA</i> (0,82)			
Mulla N <sub>2</sub> O voog	bakt 16S (-0,59), <i>nifH</i> (-0,58), <i>nirS</i> (-0,68), <i>nosZII</i> (-0,67)	bakt 16S (-0,81), arh <i>amoA</i> (-0,62), bakt <i>amoA</i> (-0,58), COMAMMOX (-0,52), <i>nifH</i> (-0,50), <i>nirK</i> (-0,59), <i>nirS</i> (-0,69), <i>nosZI</i> (-0,66), <i>nosZII</i> (-0,60), <i>nrfA</i> (0,50)	bakt 16S (-0,50), bakt <i>amoA</i> (-0,52), COMAMMOX (0,58), n-damo (0,50), <i>nosZII</i> (-0,79)	arh 16S (-0,76)	n-damo (0,79), <i>nirK</i> (0,71), <i>nosZI</i> (0,90), <i>nosZII</i> (-0,83), <i>nrfA</i> (-0,74)

Lühendid: PRE – üleujutuse eelne periood, EXP – üleujutuse periood, POST – üleujutuse järgne periood, bakt 16S – bakterite 16S rRNA, arh 16S – arhede 16S rRNA, bakt *amoA* – bakterite *amoA*, arh *amoA* – arhede *amoA*, COMAMMOX – COMAMMOX *amoA*.

**Lisa 3.** Statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ) seosed geenikoopiate arvukuste ja füüsikalis-keemiliste parameetrite vahel. Tabelis on sulgudes esitatud Spearmani korrelatsioonikoefitsient R.

Tunnus	Üleujutatud ala			Kontrollala		
	PRE	EXP	POST	PRE	EXP	POST
pH <sub>KCl</sub>	arh 16S (0,76), bakt 16S (0,82), arh <i>amoA</i> (0,56), <i>nifH</i> (0,59), <i>nirS</i> (0,93), <i>nosZII</i> (0,86)	arh 16S (0,73), bakt 16S (0,85), arh <i>amoA</i> (0,68), bakt <i>amoA</i> (0,65), COMAMMOX (0,53), <i>nirS</i> (0,74), <i>nosZI</i> (0,74), <i>nosZII</i> (0,85)	arh 16S (0,76), bakt 16S (0,68), bakt <i>amoA</i> (0,56), <i>nirS</i> (0,72), <i>nosZII</i> (0,85)	arh <i>amoA</i> (0,85), <i>n-damo</i> (0,90), <i>nirS</i> (0,77), <i>nosZII</i> (0,79)	bakt 16S (0,71), arh <i>amoA</i> (0,79)	
P (mg/kg)	arh 16S (0,72), bakt 16S (0,77), <i>nifH</i> (0,56), <i>nirS</i> (0,74), <i>nosZII</i> (0,64)	bakt 16S (0,56), <i>nirS</i> (0,59), <i>nosZI</i> (0,68)	bakt 16S (0,61), COMAMMOX (-0,59), <i>nifH</i> (0,61), <i>nirS</i> (0,51), <i>nosZII</i> (0,57)		arh 16S (0,74), bakt 16S (0,93), <i>nosZI</i> (0,74), <i>nosZII</i> (0,83)	<i>nirK</i> (-0,88), <i>nosZII</i> (0,71)
K (mg/kg)	bakt 16S (0,51), <i>nirS</i> (0,65), <i>nosZII</i> (0,68)	arh 16S (0,67), bakt <i>amoA</i> (0,51), <i>nosZII</i> (0,59)			<i>nosZII</i> (0,74)	<i>nosZI</i> (-0,81)
Ca (mg/kg)	arh 16S (0,81), bakt 16S (0,81), <i>nifH</i> (0,64), <i>nirS</i> (0,89), <i>nosZII</i> (0,84)	arh 16S (0,65), bakt 16S (0,87), arh <i>amoA</i> (0,64), bakt <i>amoA</i> (0,52), COMAMMOX (0,66), <i>nifH</i> (0,52), <i>nirS</i> (0,88), <i>nosZI</i> (0,74), <i>nosZII</i> (0,82)	arh 16S (0,86), bakt 16S (0,80), <i>nirS</i> (0,85), <i>nosZI</i> (0,67), <i>nosZII</i> (0,73)	arh 16S (0,93), <i>nosZII</i> (0,71)	bakt 16S (0,74), arh <i>amoA</i> (0,76), <i>nosZII</i> (0,71)	bakt 16S (0,74)
Mg (mg/kg)	arh 16S (0,79), bakt 15 (0,82), <i>nifH</i> (0,67), <i>nirS</i> (0,94), <i>nosZII</i> (0,83)	arh 16S (0,59), bakt 16S (0,82), <i>nifH</i> (0,54), <i>nirS</i> (0,58), <i>nosZI</i> (0,64), <i>nosZII</i> (0,69)	arh 16S (0,92), bakt 16S (0,81), arh <i>amoA</i> (0,54), bakt <i>amoA</i> (0,57), <i>nirK</i> (0,51), <i>nirS</i> (0,91), <i>nosZI</i> (0,61), <i>nosZII</i> (0,81)	arh 16S (0,81)	arh <i>amoA</i> (0,86)	bakt 16S (0,71)
Org aine (%)	arh 16S (0,53), bakt 16S (0,68), <i>nifH</i> (0,66), <i>nirK</i> (0,65), <i>nirS</i> (0,61), <i>nosZII</i> (0,62)	bakt 16S (0,69), <i>nifH</i> (0,65), <i>nosZI</i> (0,52)	arh 16S (0,50), bakt 16S (0,71), <i>nifH</i> (0,55), <i>nirS</i> (0,61), <i>nosZI</i> (0,62)	arh 16S (0,71), arh <i>amoA</i> (0,81), <i>nosZII</i> (0,74)		

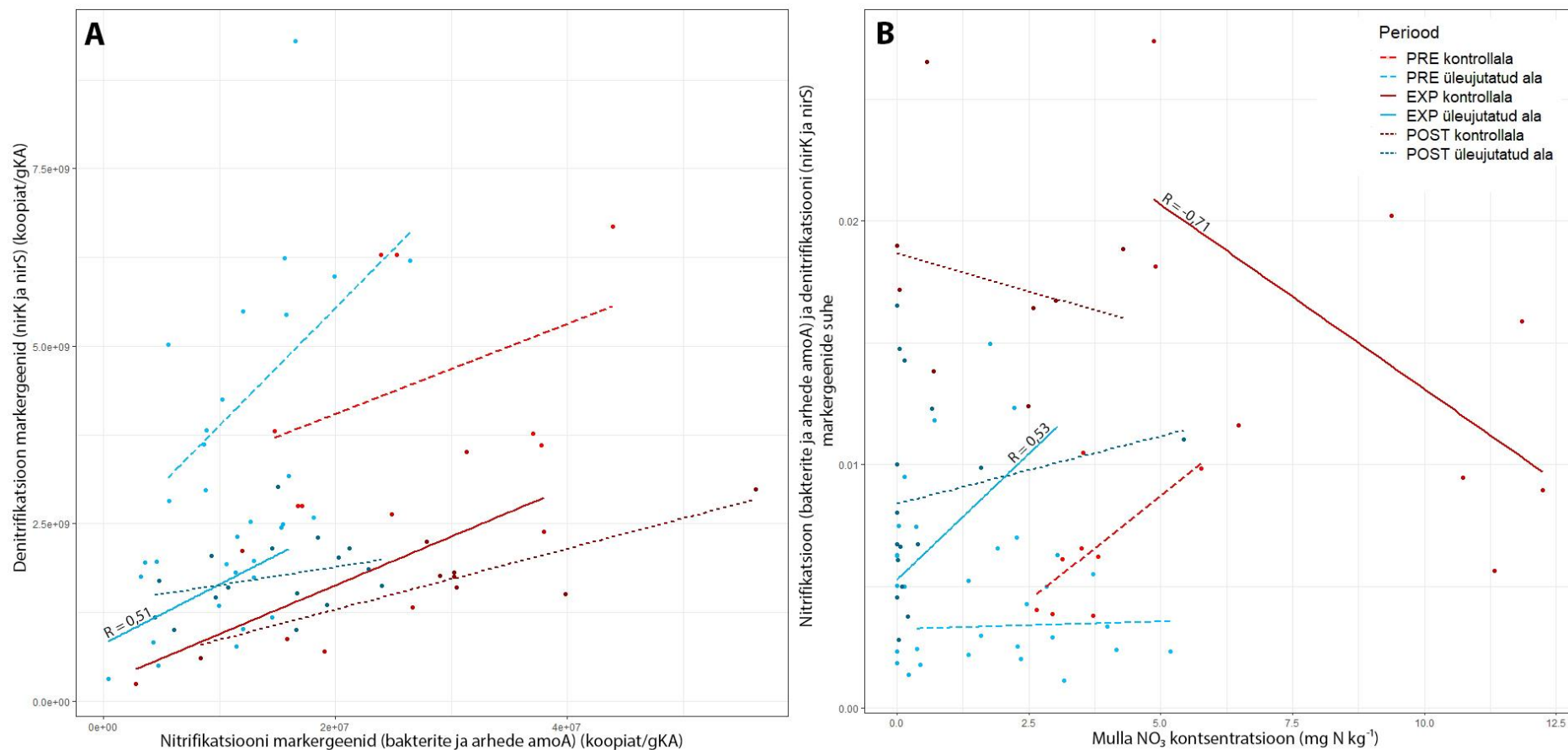
Lühendid: PRE – üleujutuse eelne periood, EXP – üleujutuse periood, POST – üleujutuse järgne periood, bakt 16S – bakterite 16S rRNA, arh 16S – arhede 16S rRNA, bakt *amoA* – bakterite *amoA*, arh *amoA* – arhede *amoA*, COMAMMOX – COMAMMOX *amoA*, P (mg/kg) – fosfor, K (mg/kg) – kaalium, Ca (mg/kg) – kaltsium, Mg (mg/kg) – magneesium, org aine (%) – orgaaniline aine.

**Lisa 4.** Statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ) seosed füüsikalise-keemiliste parameetrite ja geenikoopiate absoluutväärtuste vahel. Tabelis on sulgused esitatud Spearmani korrelatsioonikoefitsient R.

Tunnus	Üleujutatud ala			Kontrollala		
	PRE	EXP	POST	PRE	EXP	POST
N (%)	arh 16S (0,68), bakt 16S (0,81), <i>nifH</i> (0,71), <i>nirS</i> (0,75), <i>nosZII</i> (0,76)	bakt 16S (0,77), <i>nifH</i> (0,69), <i>nirS</i> (0,60), <i>nosZI</i> (0,60), <i>nosZII</i> (0,62)	arh 16S (0,54), bakt 16S (0,72), <i>nifH</i> (0,50), <i>nirS</i> (0,62), <i>nosZI</i> (0,63), <i>nosZII</i> (0,50)	arh 16S (0,76), arh <i>amoA</i> (0,90), n-damo (0,81), <i>nirS</i> (0,71), <i>nosZII</i> (0,79)	bakt 16S (0,83), <i>nosZII</i> (0,81)	
NO <sub>3</sub> -N (mg N kg <sup>-1</sup> )	bakt 16S (-0,56), <i>nifH</i> (-0,66), <i>nirS</i> (-0,55), <i>nosZI</i> (-0,55)	n-damo (0,52), <i>nirK</i> (-0,68)	COMAMMOX (0,50)		arh 16S (-0,79), <i>nirK</i> (0,86)	n-damo (0,76), <i>nirK</i> (0,71), <i>nosZI</i> (0,83), <i>nrfA</i> (-0,76)
NH <sub>4</sub> -N (mg N kg <sup>-1</sup> )		bakt <i>amoA</i> (-0,57)	arh <i>amoA</i> (-0,57), COMAMMOX (-0,55)	bakt 16S (-0,81), <i>nirK</i> (0,79), <i>nosZI</i> (-0,90)		n-damo (-0,74), <i>nirK</i> (-0,76), <i>nosZI</i> (-0,74), <i>nrfA</i> (0,79)
Mullaniiskus						arh <i>amoA</i> (0,85)
Mullatemp (sees, °C)	<i>nifH</i> (0,58)	arh 16S (0,56), <i>nirK</i> (-0,57), <i>nrfA</i> (0,61)	bakt <i>amoA</i> (-0,63)	n-damo (-0,71), <i>nirK</i> (-0,83)	<i>nirK</i> (-0,86)	<i>nosZI</i> (0,86), <i>nosZII</i> (-0,86), <i>nrfA</i> (-0,90)
Mullatemp (väljas, °C)	arh 16S (0,69), bakt 16S (0,72), <i>nifH</i> (0,74), <i>nirS</i> (0,68), <i>nosZI</i> (0,62), <i>nrfA</i> (-0,56)	arh 16S (0,68), bakt 16S (0,61), n-damo (0,57), <i>nosZII</i> (0,66)	COMAMMOX (0,57), n-damo (0,54), <i>nosZI</i> (0,66)	bakt 16S (0,83), <i>nirK</i> (-0,87), <i>nosZI</i> (0,90)	bakt <i>amoA</i> (-0,71), <i>nirK</i> (-0,79)	n-damo (0,75), <i>nosZI</i> (0,85), <i>nosZII</i> (-0,90), <i>nrfA</i> (-0,78)

Lühendid: PRE – üleujutuse eelne periood, EXP – üleujutuse periood, POST – üleujutuse järgne periood, bakt 16S – bakterite 16S rRNA, arh 16S – arhede 16S rRNA, bakt *amoA* – bakterite *amoA*, arh *amoA* – arhede *amoA*, COMAMMOX – COMAMMOX *amoA*, N (%) – üldlämmastik, NO<sub>3</sub>-N (mg N kg<sup>-1</sup>) – nitraatlämmastik, NH<sub>4</sub>-N (mg N kg<sup>-1</sup>) – ammoonium.

**Lisa 5.** Nitrifikatsiooni (bakterite ja arhede *amoA*) ja denitrifikatsiooni (*nirK* ja *nirS*) geenikoopiate arvukuste vaheline seos (A) ning nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni geenikoopiate suhte seos mulla  $\text{NO}_3^-$  kontsentratsiooniga (B). Sinisega on esitatud seosed üleujutatud alal ja punasega kontrollalal. PRE tähistab üleujutuse eelset perioodi, EXP üleujutuse perioodi ja POST üleujutuse järgset perioodi. Statistiliselt olulistele seostele on märgitud Spearmani korrelatsioonikordaja R.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristel Reiss,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Lühiajalise üleujutuse mõju mulla mikrobioloogilisele lämmastikuringele kaldaäärses lepikus“, mille juhendajad on Mikk Espenberg ja Ülo Mander reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 24.05.2021 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Kristel Reiss*

**24.05.2021**